ARZNEIMITTELINDUZIERTE LIPIDPEROXIDATION IN DER MAUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Sylvia Feuerstein
aus Volkertshausen

1981

ARZNEIMITTELINDUZIERTE LIPIDPEROXIDATION IN DER MAUS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Sylvia Feuerstein
aus Volkertshausen

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.3.81

Dekan: Prof. Dr. Ernst Reinhard

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albrecht Wendel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Weser

A b s t r a c t

Feuerstein, Sylvia

Arzneimittel-induzierte Lipidperoxidation in der Maus

Nahrungsentzug oder zweitägige Fütterung mit Saccharose senkt den Leber-Glutathionspiegel der Maus um mehr als 50 %. Akute Paracetamolintoxikation führt zu in vivo und in vitro faßbarer Lipidperoxidation. Induktion der mischfunktionellen Monooxygenase durch Phenobarbital, Benzpyren oder 3-Methylcholanthren steigert die Lipidperoxidation nach 300 mg/kg Paracetamol um den Faktor 10, 22 bzw. 28. Monooxygenase-Inhibitoren hemmen die Lipidperoxidation. Daraus wird geschlossen, daß die oxidative Metabolisierung von Paracetamol der Lipidperoxidation vorangeht.

Alimentärer Selenmangel bei Mäusen beeinflußt weder den Leber-Glutathionspiegel noch die Glutathiondepletion im Verlauf der Saccharosefütterung. Die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-S-Transferasen werden durch den Selenstatus nicht beeinflußt. Die Aktivität der Wasserstoffperoxid- und tertiär-Butylhydroperoxidsensitiven Glutathionperoxidase sinkt im Selenmangeltier auf 5 % des Kontrollwertes. Eine selenunabhängige Glutathionperoxidase, die mit Cumolhydroperoxid reagiert, wurde nachgewiesen.

Bei Diäthylmaleat-vorbehandelten Selenmangeltieren führt Intoxikation mit je 100 mg/kg Paracetamol, Äthylmorphin oder Aminoantipyrin zu starker Äthanabatmung, begleitet von extremen Anstiegen der Transaminasen im Serum, einem fast vollständigen Verlust an Leberglutathion und hoher Sterblichkeitsrate. Ein qualitativ ähnliches Ergebnis mit geringerer Äthanexhalation wurde mit 125 mg/kg Furosemid beobachtet.

Chronische Exposition gegen 710 ppm Silber im Trinkwasser äußert sich in der Maus bezüglich Arzneimittel-Sensibilität und Lebernekrose ähnlich wie alimentärer Selenmangel.

Es wird angenommen, daß reaktive Sauerstoffspezies im Verlauf der Arzneimittelmetabolisierung freigesetzt werden, die für die Lipidperoxidation und die begleitende Leberschädigung verantwortlich sind.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Wendel danke ich für seine sorgfältige Betreuung bei der Planung, Durchführung und Diskussion der Versuche. Seine Geduld und sein Humor waren mir in schwierigen Phasen dieser Arbeit eine große Hilfe.

Besonderen Dank schulde ich Frl. Martina Fausel, den Herren cands. biochem. Rudolf Reiter und Marcus Thelen und Herrn Dipl. biochem. Adelbert Grossmann für ihre selbstlose, geduldige Mitarbeit und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Kooperativität und ihr Interesse.
Weiterhin bin ich zu großem Dank verpflichtet:
Herrn Feinmechanikermeister E. Eichele und seinen Mitarbeitern in der feinmechanischen Werkstatt des Physiologisch-chemischen Institutes für die schnelle und unbürokratische Erledigung meiner kaum erfüllbaren Sonderwünsche,
den Tierpflegern am hiesigen Institut für die liebevolle Betreuung meiner Versuchstiere,
Herrn Prof. Dr. H. Pauschmann (Institut für Organische Chemie) für seine freundliche Einweihung in die Geheimnisse der Gaschromatographie
und Herrn Dr. med. K.-H. Konz für die uneigennützige Bereitstellung von Injektionsgerät.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Verwendete Abkürzungen

LPO	Lipidperoxidation
GSH-POD	Glutathionperoxidase
DEM	Maleinsäurediäthylester
MDA	Malondialdehyd
SOD	Superoxiddismutase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
BP	Benzpyren
3-MC	3-Methylcholanthren
PB	Phenobarbital
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
TRAP	Triäthanolamin-Hydrochlorid
KP_i	Kaliumphosphat-Puffer
t-BHP	t-Butylhydroperoxid
FAD	Flavinadenindinukleotid
γ-GT	γ-Glutamyltransferase
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
PTU	Propylthiouracil

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	Einleitung	1
1.1.	Hepatotoxizität von Paracetamol: A) Mensch	1
1.2.	Hepatotoxizität von Paracetamol: B) Tier	3
1.2.1.	Rolle des Arzneimittel-metabolisierenden Monooxygenasesystems der Leber	3
1.2.2.	Die spezifische Rolle von Glutathion bei der Paracetamol-induzierten Leberschädigung	4
1.2.3.	Die Natur des aktiven Paracetamolmetaboliten	5
1.2.4.	Die Rolle der Proteinbindung bei der lebertoxischen Wirkung von Paracetamol	6
1.3.	Lipidperoxidation	7
1.3.1.	Lipidperoxidation und Zellschädigung	7
1.3.2.	Schutzsysteme	9
1.3.2.1.	Abfangen freier Radikale	9
1.3.2.2.	Reduktion von Hydroperoxiden	10
1.3.2.3.	Konjugation von Fremdstoffen	12
2.	Ziel der Arbeit	13
3.	Materialien und Methoden	14
3.1.	Materialien	14
3.1.1.	Tierfutter	14
3.1.2.	Tiere	14
3.1.3.	Chemikalien	15
3.1.4.	Geräte	16
3.2.	Methoden	17
3.2.1.	Verabreichungsform verschiedener Pharmaka	17
3.2.2.	Induktion des Monooxygenasesystems	17
3.2.3.	Hemmung des Monooxygenasesystems	18
3.2.4.	Bestimmung der Lipidperoxidation in vivo	18

3.2.5.	Bestimmung der Lipidperoxidation in vitro	19
3.2.6.	Bestimmung des löslichen Gesamtglutathions	20
3.2.7.	Bestimmung von GSSG	20
3.2.8.	Bestimmung der Serumtransaminasen	21
3.2.9.	Plasma-Vitamin-E-Bestimmung	21
3.2.10.	Bestimmung der Aktivität der selenhaltigen Glutathionperoxidase in Leber und Blut	21
3.2.11.	Differenzierung zwischen selenhaltiger und nicht-selenhaltiger Glutathionperoxidase	22
3.2.12.	Bestimmung der Glutathionreduktaseaktivität in der Mäuseleber	22
3.2.13.	Bestimmung der Glutathion-S-Transferaseaktivität in der Mäuseleber	23
3.2.14.	Die Aktivität der Superoxiddismutase in der Mäuseleber	23
3.2.15.	Bestimmung der Katalaseaktivität in der Mäuseleber	23
3.2.16.	Bestimmung von Cytochrom-P-450 in Mäuselebermikrosomen	25
3.2.17.	Proteinbestimmung	25
3.2.18.	Bestimmung des Fettsäuremusters in Mäuseleberextrakten	25
4.	Resultate	27
4.1.	Das Kohlenwasserstoffmuster in der Ausatmungsluft pharmakabelasteter Mäuse	27
4.2.	Metabolismus verschiedener niederer Kohlenwasserstoffe in vivo	28
4.3.	Die Variabilität des Gesamtglutathiongehalts der Mäuseleber in Abhängigkeit von Hunger, Sucrosediät und Futter	29
4.4.	Der Einfluß verschiedener Induktoren des mischfunktionellen Monooxygenasesystems der Leber auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo	32

4.5.	Der Einfluß verschiedener Hemmer des mikrosomalen Monooxygenasesystems auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo	33
4.6.	In-vivo- und in-vitro-LPO durch Intoxikation mit verschiedenen Pharmaka in Abhängigkeit vom Selenstatus	35
4.7.	Fettsäuremuster der Mäuseleber nach LPO	41
4.8.	Verschiedene Enzym- und Substratparameter der Mäuseleber in Relation zum Selenstatus	42
4.8.1.	Glutathionperoxidase	42
4.8.2.	Gesamtglutathion, oxidiertes Glutathion und Glutathionreduktase	43
4.8.3.	Glutathion-S-Transferasen	43
4.8.4.	Andere Parameter	44
4.9.	Der Einfluß von Propylthiouracil (PTU) auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo	44
4.10.	Schwermetallintoxikation Einfluß auf die Arzneimittel-induzierte LPO in vivo	46
5.	Diskussion	49
5.1.	Zur Natur und Signifikanz abgeatmeter Kohlenwasserstoffe	49
5.2.	Endogene Beeinflussung des Glutathiongehaltes der Mäuseleber	50
5.3.	Die Rolle des mischfunktionellen Monooxygenasesystems	51
5.3.1.	Mögliche molekulare Ursache der Paracetamol-induzierten Lipidperoxidation	54
5.4.	Arzneimittel-induzierte Lipidperoxidation	55
5.4.1.	Diäthylmaleat als GSH-Depletor	55

5.4.2.	Lipidperoxidation und Selenstatus	57
5.5.	Propylthiouracil-Einfluß auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation	58
5.6.	Schwermetallintoxikation	59
5.7.	Schlußfolgerungen	61
5.8.	Offene Fragen	63
	Literaturverzeichnis	64
	Lebenslauf	69

1. E I N L E I T U N G

1.1. Hepatotoxizität von Paracetamol

A: Mensch (Review 1)

Die antipyretische Wirkung von Acetanilid, Phenacetin und Paracetamol (Acetaminophen) ist schon seit Ende des 19.Jahrhunderts bekannt; klinisch wurde vorwiegend Phenacetin eingesetzt. Inzwischen wurde das nephrotoxische Phenacetin durch Paracetamol ersetzt.

Paracetamol wirkt mild analgetisch und antipyretisch und zeigt bei therapeutischer Dosierung keine toxischen Nebeneffekte. Bei akuter Überdosierung (~10 g /Erwachsenen) manifestieren sich 48-72 Stunden nach oraler Aufnahme die ersten klinisch und biochemisch faßbaren Anzeichen einer Leberschädigung. Extreme Aktivitätsanstiege von Glutamat-Oxalacetat- und Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum und Erhöhung der Prothrombinzeit begleiten die histopathologisch nachweisbare Nekrotisierung des Lebergewebes. Entsprechende Veränderungen in Niere und Herz werden ebenfalls beobachtet. Gleichzeitig ändert sich auch das Metabolitenmuster von Paracetamol im Harn.

Bei therapeutischer Dosierung werden ca. 85-90 % des applizierten Paracetamols in Form des Glucuronsäure- und Sulfat-Konjugats über den Harnweg ausgeschieden. Nur ca. 5 % der Dosis wird über das Hydroxylierungssystem der Leber oxidiert. Der resultierende elektrophile Paracetamolmetabolit wird nach Konjugation mit dem stark nucleophilen Tripeptid Glutathion (γ-Glutamylcysteinylglycin) und nach weiterer Metabolisierung als N-Acetylcystein-Derivat (=Mercaptursäure) im Harn ausgeschieden. Bei Paracetamolüberdosierung wird die Konjugationskapazität für die Sulfatierung und Glucuronidierung überschritten. Der Anteil an oxidativ metabolisiertem Paracetamol steigt deshalb an. Vermehrte Mercaptursäureausscheidung

und eine drastische Absenkung des Leberglutathionspiegels sind die Folge.

Beim Tier wurde die schützende Rolle von Glutathion bei der Paracetamolvergiftung intensiv studiert. Vorherige Absenkung des Leberglutathions durch alimentäre Maßnahmen [2,3,4] oder durch Verabreichung Glutathion-absenkender Agentien [5] führt in der Leber schon bei subtoxischen Paracetamoldosen zur Ausbildung zentrilobulärer Nekrosen [3,6,7]. Umgekehrt schützt die Verabreichung von Glutathionbiosynthesevorstufen (Cystein, Methionin) oder die Applikation nichtkörpereigener Sulfhydrylreagentien (Cysteamin, Dimercaprol) vor den Konsequenzen der Paracetamolüberdosierung [6,8]. Diese nucleophile Therapie ist aber nur dann effektiv, wenn die oben erwähnten SH-Agentien vor oder kurz nach Paracetamol appliziert werden. Eine postapplikative Toleranz tritt ein, bis das Leberglutathion durch Konjugation mit dem Paracetamolmetaboliten unter einen kritischen Grenzwert abgesunken ist.

Diese Erfahrung aus dem Tiermodell führte zur Entwicklung einer klinischen "nucleophilen Therapie" gegen die Paracetamolvergiftung beim Menschen.

1974 wurde erstmals Cysteamin erfolgreich eingesetzt, kam aber wegen starker zentralnervöser Nebeneffekte nicht zu größerem klinischen Einsatz.

Oral verabreichtes Methionin und intramuskulär appliziertes Dimercaprol zeigten bei geringeren Nebenwirkungen nur einen mäßigen Schutz. Ebenso konnte (D)-Penicillamin auf Grund seiner starken Nephrotoxizität nur beschränkt eingesetzt werden [9].

Hohe orale Dosen oder kleine intravenös applizierte Mengen von N-Acetylcystein bieten dagegen bei geringen Nebeneffekten zeitlich begrenzt einen gewissen Schutz vor der

Paracetamol-induzierten Leberschädigung.

1.2. Hepatotoxizität von Paracetamol
B: Tier

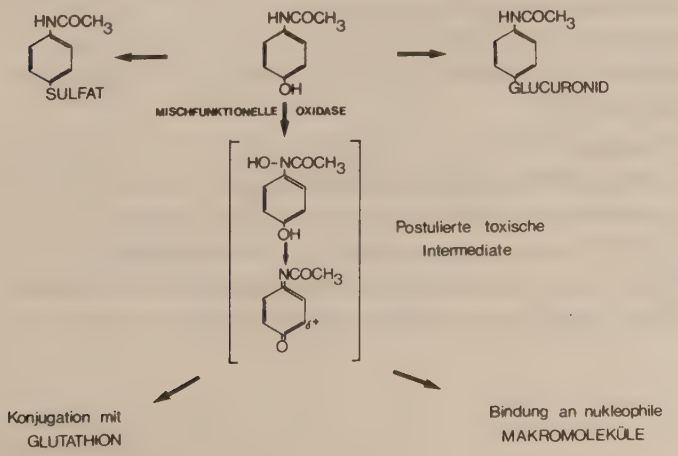
1.2.1. Rolle des Arzneimittel-metabolisierenden Monooxygenasesystems der Leber

Die Aktivität des mikrosomalen Monooxygenasesystems der Leber beeinflußt das Ausmaß der Paracetamol-induzierten Lebernekrotisierung.

Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren-Induktion steigern in Maus und Ratte die Hepatotoxizität von Paracetamol, während bei der Hemmung des Cytochrom-P-450-Systems durch Piperonylbutoxid und Kobaltchlorid die Nekrotisierung der Leber verringert ist [10]. In gleicher Weise wird das Ausmaß der Proteinbindung des aktiven Paracetamolmetaboliten durch die Aktivität des mikrosomalen Monooxygenasesystems moduliert [11].

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Proteinbindung des Metaboliten und pathologische Veränderungen in der Leber erst dann signifikant auftreten, wenn die Paracetamoldosis so hoch gewählt wird, daß eine 70-80 % ige Absenkung des Leberglutathions resultiert [6].

Aus diesen Befunden wurde folgendes Schema über die Bioaktivierung von Paracetamol entwickelt:



Die Paracetamol-induzierte Lebernekrose manifestiert sich vorwiegend zentrilobulär [10]. Hier ist die Konzentration der mischfunktionellen Monooxygenase etwa doppelt so hoch wie im periportalen Bereich und wird durch Phenobarbital-Induktion selektiv gesteigert [12]. Umgekehrte Konzentrationsgradienten weist dagegen Glutathion innerhalb des Leberläppchens auf [13].

Aus diesen Befunden läßt sich die verstärkte Anfälligkeit des zentrilobulären Leberbereichs gegenüber toxischen, arylierenden Metaboliten zwanglos erklären.

1.2.2. Die spezifische Rolle von Glutathion bei der Paracetamol-induzierten Leberschädigung

Das Tripeptid Glutathion spielt als spezifisches Substrat der Glutathionperoxidase [14] bei der Entgiftung toxischer Hydroperoxide in der Zelle eine wichtige Rolle. Dadurch stabilisiert es indirekt die Sulfhydrylgruppen vieler Enzyme und schützt Hämoglobin und andere Substanzen vor Oxidation.

Glutathion ist weiterhin einer der wichtigsten Konjugationspartner gegenüber Fremdsubstanzen. Dies spielt bei der Paracetamolbiotransformation eine entscheidende Rolle.

In isolierten Mäusehepatocyten korreliert die Bildung des Paracetamol-Glutathion-Konjugats direkt mit der Abnahme an intrazellulärem Glutathion und dem Verlust der Integrität des Hepatocyten [15]. Vorbehandlung mit Glutathion-absenkenden Mitteln potenziert diese Schädigung im Hepatocyten drastisch.

Die schützende Wirkung von Cystein, Methionin und N-Acetylcystein in diesem System wird auf eine gesteigerte Glutathion-de-novo-Synthese zurückgeführt [15]. Auch in den Nieren führt Paracetamol-Intoxikation dosisabhängig zu Glutathionverlust und signifikanter Proteinbindung des Metaboliten [16].

Alle diese Befunde berechtigen zu der Annahme, daß Glutathion eine fundamentale Schutzfunktion im Organismus gegen die Schädigung durch elektrophile Arzneimittelmetaboliten und arylierende Agentien einnimmt.

1.2.3. Die Natur des aktiven Paracetamolmetaboliten

Gemäß der herrschenden Modellvorstellung wird Paracetamol über das mikrosomale Monooxygenasesystem der Leber in einer Sauerstoff- und $NADPH_2$-abhängigen Reaktion zu N-Hydroxy-Paracetamol oxidiert [11].

Durch spontane Wasserabspaltung entsteht dann das eigentliche toxische, elektrophile Agens N-Acetyl-Imidochinon [17], welches entweder durch Konjugation mit Glutathion entgiftet wird oder irreversibel an Makromoleküle bindet. Neuere Arbeiten stellen diese hypothetischen Menchanismen jedoch in Frage:

N-Hydroxy-Paracetamol scheint nicht an der Bildung des arylierenden Agens beteiligt zu sein [18,20]. Die Halbwertzeit von synthetischem N-Hydroxy-Paracetamol beträgt unter physiologischen Bedingungen etwa 15 Minuten [19]. Daher ist es unwahrscheinlich, daß dieses Agens in vivo spontan Wasser abspaltet. Weiterhin wirkt dieses Paracetamolderivat in vivo nur geringfügig toxischer als Paracetamol allein [21].

Im Gegensatz zu N-Hydroxy-Paracetamol kann 3-Hydroxy-Paracetamol als eines der Oxidationsprodukte von Paracetamol in Mikrosomensuspensionen identifiziert werden [22], seine Zelltoxizität ist aber ebenfalls nur gering.

Indirekt konnte Paracetamolepoxid als hypothetisches erstes Oxidationsprodukt von Paracetamol ausgeschlossen werden [23].

Obwohl in der Zwischenzeit Beweise für die Existenz von N-Acetyl-Imidochinon im mikrosomalen Inkubations-

system mit Paracetamol erbracht wurden [23], bleibt die Frage nach der chemischen Natur und Reaktivität dieser prospektiven Oxidationsprodukte von Paracetamol weiterhin unbeantwortet.

1.2.4. Die Rolle der Proteinbindung bei der lebertoxischen Wirkung von Paracetamol

Die zellschädigende Wirkung hoher Paracetamoldosen wird nach der heutigen Vorstellung auf die Bindung des reaktiven Metaboliten an essentielle Makromoleküle zurückgeführt. Dies führt zu Funktionsverlust der Zelle und letztlich zum Zelltod.

Die Stärke der Paracetamol-induzierten Lebernekrose und das Ausmaß der kovalenten Bindung zeigen qualitativ die gleiche Dosisabhängigkeit. Die maximale Bindungsrate des Metaboliten geht hierbei der histopathologisch nachweisbaren Nekrotisierung etwa 1-2 Stunden voraus [24]. Veränderung der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Paracetamol durch Modulation des Monooxygenasesystems beeinflußt die Proteinbindung und den Nekrosegrad gleichsinnig [24].

Es gibt andererseits jedoch einige Arbeiten, die im speziellen Fall von Paracetamol das Proteinbindungs-Zelltoxizitätsprinzip in Frage stellen:

α-Mercaptopropionylglycin-Vorbehandlung schützt vor Paracetamol-induzierter Lebernekrose, ohne entsprechend das Ausmaß der Metabolitenbindung herabzusetzen [25]. Entsprechend wirken auch Cystein und N-Acetylcystein [26].

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß der Metabolit einer Fremdsubstanz in großen Mengen kovalent im Gewebe binden kann, ohne sichtbare Organfunktionsstörungen hervorzurufen [27,28]. Die Kausalität von Proteinbindung und Zelltoxizität scheint zumindest im Falle von Paracetamol nicht gewährleistet zu sein.

1.3. Lipidperoxidation

1.3.1. Lipidperoxidation und Zellschädigung

Im Zusammenspiel der verschiedenartigen Funktionseinheiten einer Zelle spielt die biologische Membran eine besonders wichtige Rolle. Integrationsverlust und Permeabilitätsänderung einer Membran durch Peroxidation führt zur Schädigung des gesamten Zellsystems und letztlich zum Zelltod.

Membranen enthalten einen großen Anteil hochungesättigter Lipide, die in Gegenwart von Sauerstoff und Radikalketteninitiatoren sehr leicht oxidiert werden. Dieser unter dem Begriff Lipidperoxidation bekannte Prozeß spielt im lebenden Organismus wahrscheinlich bei Alterungsprozessen, bei Zellschädigung durch Umweltgifte, bei einigen Phasen der Atherosklerose, mit Sicherheit bei einigen Lebererkrankungen und bei der Sauerstoffvergiftung eine wichtige Rolle.

Das folgende Schema gibt in vereinfachter Form den Freien-Radikal-Mechanismus der Lipidperoxidation wieder [29]:

H·-Abstraktion einer ungesättigten Fettsäure (RH) durch einen Radikalstarter:

$$RH \longrightarrow R\cdot$$

Bildung eines Fettsäureperoxyradikals:

$$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$$

Bildung eines Fettsäurehydroperoxids:

$$ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$$

Abfangen freier Fettsäureradikale durch ein Antioxidans (AH):

$$ROO\cdot \text{ (oder } R\cdot) + AH \longrightarrow ROOH \text{ (oder } RH) + A\cdot$$

Kettenabbruch:

$$ROO\cdot \text{ (oder } R\cdot) + R\cdot \longrightarrow ROOH \text{ (oder } R_2)$$

Das semistabile Fettsäurehydroperoxid kann durch homolytische Spaltung weitere Radikale erzeugen:

$$ROOH \longrightarrow RO\cdot + OH\cdot$$

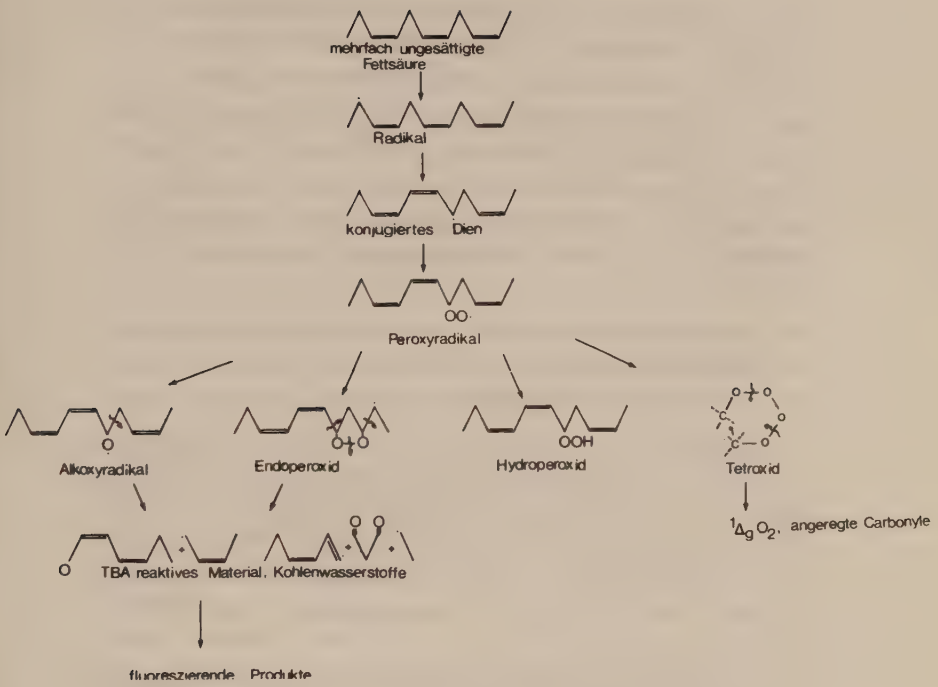
$$2\ ROOH \longrightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$$

Fettsäurehydroperoxide sind nach dieser Hypothese in der Lage, die Zerstörung von Zellmembranen zu katalysieren.

Besonders eindrücklich wurde die Toxizität oxidierten Fettes oder reiner Fettsäurehydroperoxide in vivo nachgewiesen [30], wodurch insbesondere die Lunge der Versuchstiere betroffen ist. Die Ursache für die auffällige Organselektivität ist allerdings nicht bekannt. Ebenso ist die chemische Struktur des Radikalstarters nicht sicher nachgewiesen. Als mögliche Kandidaten wurden das Hydroxylradikal, insbesondere aber Singulett-Sauerstoff und das Superoxidradikal diskutiert.

Die analytische Bestimmung eines Lipidperoxidationsprozesses erfolgt indirekt über die Quantifizierung sekundärer Oxidationsprodukte von Lipiden.

Das folgende Schema zeigt den Mechanismus der Peroxidation einer polyungesättigten Fettsäure und die Bildung sekundärer Oxidationsprodukte [29]:



1.3.2. Schutzsysteme

Im Hinblick auf die dramatischen Konsequenzen der Lipidperoxidation für den Organismus muß den zelleigenen Schutzsystemen besondere Bedeutung beigemessen werden.

1.3.2.1. Abfangen freier Radikale

1) Vitamin E (α-Tocopherol) ist ein integraler Bestandteil biologischer Membranen. Sehr viele Hinweise sprechen dafür, daß Vitamin E in vitro und in vivo als Radikalfänger und Singulett-Sauerstoffquencher in der Lipidphase fungiert [31]. Diese Vorstellung

wird unterstützt durch die synergistische Wirkung synthetischer, meist strukturverwandter Antioxidantien, insbesondere bei Vitamin-E-Mangel [32].

2) Das Metalloprotein Superoxiddismutase (Erythrocuprein, Hämocuprein, Cerebrocuprein) katalysiert die Dismutation des reaktiven, radikalischen Sauerstoffanions $O_2^{-}\cdot$ zu Triplett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid [33]. Dieses Enzym tritt in der Natur in drei verschiedenen Formen auf:

   a) das ausschließlich eukariotische Kupfer-Zink-Enzym,
   b) das prokariotische Eisen-Enzym,
   c) das mitochondriale Mangan-Enzym.

   Die höchsten Superoxiddismutase-Aktivitäten findet man in Zellen mit hoher Sauerstoffumsatzrate; hier wird ein Teil des Sauerstoffs zu Superoxid reduziert, wie z.B. bei der Autoxidation von Katecholaminen, Thiolen und Hämoproteinen und im Verlauf verschiedener Enzymreaktionen: Xanthinoxidase, Aldehydoxidase, Dihydroorotsäureoxidase etc.

   Die Schutzwirkung von Superoxiddismutase bei sauerstoffpotenzierter Strahlenschädigung von DNA, Viren, Säugerzellkulturen, Bakteriophagen und sogar von Mäusen in vivo ist ein guter Hinweis auf die physiologische Schutzfunktion dieses Enzyms [29].

1.3.2.2. Reduktion von Hydroperoxiden

1) Das Selenoenzym Glutathionperoxidase (E.C.1.11.1.9) reduziert Wasserstoffperoxid, organische Hydroperoxide und Fettsäurehydroperoxide zu Wasser, den entsprechenden Alkoholen bzw. zu den nichttoxischen Monohydroxyfettsäuren. Dabei wird reduziertes Glutathion zu GSSG oxidiert [34]. Die höchsten Enzymaktivitäten findet man in der Leber, gefolgt von Erythrozyt, Herz, Lunge und

Niere, hingegen nur geringe Aktivität im Skelettmuskel und im Intestinaltrakt [35].

Intrazellulär verteilt sich auf das cytosolische Kompartiment etwa 70 % und auf die Mitochondrien 30 % der Gesamtaktivität [14].

Interessanterweise enthalten die Peroxisomen keine Glutathionperoxidase. Hier wird die Entgiftung des toxischen Wasserstoffperoxids allein über die Kataseaktivität kontrolliert [36].

Die postulierte Reduktion peroxidierter Membranlipide durch Glutathionperoxidase konnte noch nicht nachgewiesen werden, da der Beweis für die Existenz von Monohydroxyfettsäuren in Membranen bis jetzt noch aussteht [37]. Die peroxidatische Wirksamkeit der Glutathionperoxidase in vitro kann am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber direkt am Ausmaß des GSSG-Ausflusses nach Peroxidbelastung gemessen werden [38,39].

Noch eindrücklicher zeigt sich die Schutzfunktion der selenhaltigen Glutathionperoxidase in vivo. Die Kombination von Selen- und Vitamin-E-Mangel in der Ratte erzeugt Lipidperoxidation, die sich an der Äthanexhalation und der Lebernekrotisierung [40] nachweisen läßt.

2) Neben der selenhaltigen Glutathionperoxidase existiert eine weitere glutathionabhängige nicht-selenhaltige Peroxidase, die aber im Unterschied zur Se-GSH-POD nur organische Hydroperoxide reduziert [41,42].

PROHASKA [43] identifizierte diese Glutathionperoxidase als ein Enzym aus der Familie der Glutathion-S-Transferasen. Nach LAWRENCE [44] ist die nicht-selenhaltige Peroxidase mit der Glutathion-S-Transferase B identisch. Im Selenmangel bei Ratten sinkt die Aktivität des Selenoenzyms unter die Nachweisgrenze, während

die nicht-selenhaltige GSH-POD leicht erhöht ist [44]. Ob diese GSH-Peroxidase die Hydroperoxidentgiftung im Selenmangel übernehmen kann, ist bis jetzt noch ungeklärt.

3) Ein weiteres Schutzenzym, das Häm-Eisen-Protein Katalase ist ubiquitär in allen organischen Geweben, insbesondere in Leber und roten Blutzellen zu finden. In den Peroxisomen der Zellen katalysiert es die Zersetzung des von den Oxygenasen erzeugten Wasserstoffperoxids zu Sauerstoff und Wasser. Über die physiologische Rolle der Katalase besteht noch keine volle Klarheit. Wasserstoffperoxid selbst ist ein starkes Zellgift und ist möglicherweise auch bei der Entstehung von Hydroxylradikalen und Singulett-Sauerstoff ursächlich beteiligt. Deshalb muß die Katalase ebenso wie Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase(n) als ein wichtiges Schutzenzym gegen oxidative Zellschädigung betrachtet werden.

1.3.2.3. Konjugation von Fremdstoffen

Die cytosolisch lokalisierten Glutathion-S-Transferasen katalysieren mit unterschiedlicher Spezifität die Konjugation von Fremdsubstanzen mit Glutathion. Hierbei findet im Unterschied zur Glucuronidierung und Sulfatierung keine vorherige Aktivierung eines Konjugationspartners statt. Das Konjugat wird wegen seines anionischen Charakters und seiner Molekülgröße (>300 D) vorwiegend biliär ausgeschieden [45]. Im Darmlumen oder im Nephron wird das Konjugat nach Abspaltung des γ-Glutamyl- und Glycylrestes und nach n-Acetylierung der Cysteingruppe als Mercaptursäure im Harn ausgeschieden [46].

Es wurden inzwischen fünf verschiedene GSH-S-Transferasen aus der Rattenleber und ebensoviele aus der mensch-

lichen Leber isoliert und charakterisiert [47].

Eine Besonderheit in dieser Enzymfamilie ist die Glutathion-S-Transferase B, die wegen ihrer Bindungsfähigkeit für große Liganden wie z.B. Steroide, Bilirubin, Karzinogene und andere organische Anionen auch Ligandin benannt ist [48]. Außerdem ist dieses Enzym, wie bereits erwähnt, mit der nicht-selenhaltigen Glutathionperoxidase identisch [44]. Inzwischen wurde die peroxidatische Aktivität einer zweiten GSH-S-Transferase (AA) in Rattenleber nachgewiesen [49].

2. ZIEL DER ARBEIT

Immer mehr Hinweise sprechen für die Beteiligung der Lipidperoxidation bei Membranschädigung, Zellyse und Organnekrosen.

Frühere Arbeiten [2] zeigen, daß Paracetamolintoxikation bei gehungerten Mäusen in vivo dosisabhängig zu Lipidperoxidation führt. Hier soll untersucht werden, in welchem Ausmaß die Aktivität des mischfunktionellen Monooxygenasesystems die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation beeinflußt. In Erweiterung dieses Komplexes soll geprüft werden, ob andere Pharmaka, die ebenfalls über das Cytochrom-P-450-System metabolisiert werden, unter entsprechenden Bedingungen zu Lipidperoxidation führen. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Konjugation eines Phase I-Metaboliten mit Glutathion (Phase II) eine notwendige Voraussetzung für die Lipidperoxidation ist, bzw. ob sich die Phase-II-Biotransformation durch glutathionabsenkende Agentien imitieren lässt. Besonderes Augenmerk soll dem zellulären Schutzenzym Glutathionperoxidase gewidmet werden.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Tierfutter

Das Normalfutter (Diät C 1018 Vitamin-E-arm) wurde von der Fa.Altromin, Lage (Lippe) in pelletierter Form geliefert. Auf Wunsch wurde die Diät nicht wie üblich mit 1 ppm Selen supplementiert, sowie der Palmitinanteil durch Sojaöl ersetzt.
Die Zusammensetzung war wie folgt:

Stärke	53 %
Sucrose	10 %
Casein	22 %
Sojaöl	3 %
Salzmischung	6 %
Vitaminmischung	2 %

Die Selenmangeldiät wurde von der Fa.ICN Nutritional Biochemicals Cleveland/Ohio (USA) in pelletierter Form in folgender Zusammensetzung geliefert:

Torula Hefe	30 %
Sucrose	61 %
Sojaöl	3 %
Salzmischung	5 %
Vitaminmischung	1 %

Die Kontrolldiät war mit 0.5 ppm Selen in Form von Natriumselenit supplementiert.

3.1.2. Tiere

Männliche Albinomäuse (Tierfarm Hannover) wurden in Gruppen zu je zehn Tieren unter natürlichen Tag/Nacht-Lichtverhältnissen in Kunststoffkäfigen gehalten. Die bei der Ankunft durchschnittlich 15 g schweren Tiere wurden mindestens 4, maximal 8 Wochen mit dem jeweiligen Futter ernährt.

Tiere auf Normalfutter erhielten Trinkwasser ad libitum, Selen-Mangel bzw. Selen-supplementierte Tiere bidestilliertes Wasser ad libitum. 48 Std. vor Versuchsbeginn wurde das jeweilige Futter entzogen und das Trinkwasser durch eine 10%ige Sucrose-Lösung ersetzt.

3.1.3. Chemikalien

Firma Sigma, München:

Ethacrynsäure
N-Acetyl-p-Aminophenol (Paracetamol)
7-Äthoxycumarin
Fettsäuremethylesterstandards
3-Methylcholanthren
Benzpyren
Bathophenanthrolin

Firma Fluka, Ulm:

1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
Natriumdiäthyldithiocarbamat
Pyrazol
α-Naphthoflavon
Perfluorhexan
Maleinsäurediäthylester

Firma Serva Feinbiochemika, Heidelberg:

6-(n-Propyl)-2-Thiouracil
Heparin-Natrium

Firma EGA-Chemie, Steinheim:

2-Thiobarbitursäure
Dimethylaminoantipyrin

Firma Merck, Darmstadt:

Phenobarbital
Äthylmorphin

Furosemid - Firma Hoechst AG, Frankfurt/Main
Metyrapon - Firma Ciba Geigy, Basel/Schweiz
SKF 525 A (2-Diäthylaminoäthyl-2,2-Diphenylvaleriat)
- Firma Smith, Kline und French, Brüssel
Malondialdehyd-bis-diäthylacetal
- Firma Schuchardt/München

Reduziertes und oxidiertes Glutathion
- Firma Boehringer/Mannheim

Atemkalk "Sodasorb"
- Firma Rhein Pharma-Arzneimittelwerk Planckstadt.

Alle übrigen Chemikalien waren pro-analysi-Substanzen der Firmen Boehringer, Merck, Sigma und Fluka.

3.1.4. Geräte

Für die Kohlenwasserstoffanalyse:

Gaschromatograph: Fractovap 2150 - Firma Erba Science, Hofheim
Integrator : Minigrator, Spectra Physics

Für díe Fettsäureanalyse:

Gaschromatograph: HP 5750 - Firma Hewlett Packard

Beide Gaschromatographen sind mit einem Flammenionisations-detektor ausgestattet.
UV - 210 A Split Beam Photometer
UV - 300 Dual Wavelength Photometer
- Firma Shimadzu, Düsseldorf

3.2. Methoden

3.2.1. Verabreichungsform verschiedener Pharmaka

Die Applikation aller hier aufgeführten Pharmaka erfolgte intraperitoneal.

Substanz	Lösungsmittel	applizierte Menge
Paracetamol Aminoantipyrin Propylthiouracil 7-Äthoxycumarin	Dimethylsulfoxid	2 ml/kg
Äthylmorphin Furosemid Pyrazol Diäthyldithiocarbamat Metyrapon SKF-525 A Phenobarbital	0.9 % NaCl-Lösung	5 ml/kg
Perfluorhexan α-Naphthoflavon Benzpyren 3-Methylcholanthren	Sesamöl	5 ml/kg
Diäthylmaleat	20 % (w/v) in Sesamöl	2 ml/kg

3.2.2. Induktion des Monooxygenasesystems

Nach einer einmaligen Phenobarbitaldosis von 80 mg/kg i.p. wurden die Tiere für weitere vier Tage mit einer 0.1 %igen PB-Lösung im Trinkwasser supplementiert. 48 Std. vor Versuchsbeginn wurde Phenobarbital abgesetzt.

Benzpyren oder 3-Methylcholanthren wurde in einer Einzeldosis von 20 mg/kg an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p. verabreicht, die letzte Applikation erfolgte 24 Std. vor Versuchsbeginn.

3.2.3. Hemmung des Monooxygenasesystems

Dieäthyldithiocarbamat, SKF-525 A, Metyrapon, Pyrazol, Perfluorhexan und α-Naphthoflavon wurden 30 Minuten vor Paracetamol i.p. appliziert.

3.2.4. Bestimmung der Lipidperoxidation in vivo

In Erweiterung der Methode von RIELY und COHEN [50] wurde die Äthanabatmung lebender Tiere als Index für Lipidperoxidation bestimmt.

Je ein Tier wurde maximal 4-6 Std. in einem 500 ml Plexiglas-Exsiccator eingeschlossen. Der Exsiccatorraum stand über einen Dreiweghahn mit einem sauerstoffgefüllten Ballon in Verbindung. Abgeatmetes Kohlendioxid und Wasser wurden an 120 g Atemkalk adsorbiert. Vor der Probeentnahme wurde der Gasraum im Exsiccator durch mehrmaliges Aufziehen einer 20 ml-Spritze gut durchgemischt, dann wurden genau 10 ml Gasprobe entnommen und in die Probenaufgabeschleife des Gaschromatographen entleert.

Die einzelnen Kohlenwasserstoffe wurden isotherm bei 70°C auf einer 5 m langen Porasil-C-Säule (Ø 4 mm) aufgetrennt und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors bei höchster Empfindlichkeitsstufe quantitativ analysiert. Die Geräteeinstellung war wie folgt:

Gasflüsse:	Stickstoff (Trägergas)	30 ml/min
	Synthetische Luft	570 ml/min
	Wasserstoff	23 ml/min
Elektrometerempfindlichkeit:		0.1 pA/mV

Die Kalibrierung der Analysen erfolgte mit Eichgas der Fa. Messer Griesheim/Duisburg:

Äthaneichgas in synthetischer Luft:		0.73 vpm
Eichgemisch in Stickstoff	: Äthylen	0.82 vpm
	Propan	1.0 vpm
	n-Butan	0.83 vpm
	n-Pentan	0.61 vpm

Die Nachweisgrenze für Äthan war 0.5 pMol/ml Gasprobe. Die Chromatogramme wurden planimetrisch oder mit Hilfe eines Integrators quantifiziert.

Unter Berücksichtigung der bei jeder Probeentnahme erfolgten Verdünnung der Exsiccatoratmosphäre durch nachströmenden Sauerstoff (10 ml) aus dem Reservoir wurde die pro kg Tier abgeatmete Kohlenwasserstoffmenge nach folgender Gleichung berechnet:

$$\left[\frac{C_{St}}{S_{St}} \times S_{Probe} \times (V-v) + \sum_{o}^{n-1}\left(\frac{C_{St}}{S_{St}} \times S_{Probe} \times 10\right)\right] \cdot G^{-1} = \frac{nMol}{kg}$$

C = Konzentration des betreffenden Kohlenwasserstoffes im Eichgas (pMol/ml)

S_{St} = Signal des Standards

S_{Probe} = Signal der Probe bei der n-ten Entnahme

V = Exsiccatorvolumen (ml)

v = Volumen des Tieres (ml), näherungsweise Gewicht (g) = Volumen (ml)

G = Gewicht des Tieres (g)

n = Anzahl der Probenentnahmen

3.2.5. Bestimmung der Lipidperoxidation in vitro

Malondialdehyd, eines von mehreren Zerfallsprodukten peroxidierter Lipide, reagiert mit Thiobarbitursäure zu einem Trimethinfarbstoff, der bei 535 nm ein Absorptionsmaximum besitzt.

Das von HEATH und PACKER [51] beschriebene Testverfahren wurde leicht modifiziert:

Die hämoglobinfrei perfundierte Mäuseleber wurde in eiskalter 3%iger Metaphosphorsäure (1 mM EDTA) homogenisiert (20 % w/w) und ein 500 µl Aliquot des Rohhomogenats in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml Testlösung (8 % w/v Trichloressigsäure, 0.2 % Thiobarbitursäure) 30 Minuten bei 95°C inkubiert. Dann wurde 2 Minuten in der Eppendorfzentrifuge zentrifugiert und die Extinktion des klaren Überstandes bei 532 nm gegen einen Reagentienleerwert gemessen.

Kalibriert wurde mit Malondialdehyd-bis-diäthylacetal.

3.2.6. Bestimmung des löslichen Gesamtglutathions:

Das lösliche Gesamtglutathion wurde im metaphosphorsauren Überstand des Leberhomogenats mit Hilfe des gekoppelten Tests nach J.BREHE und H.BURCH bestimmt [52].

3.2.7. Bestimmung von GSSG [53]

Die Bestimmung von GSSG beruht auf folgender Enzymreaktion:

$$GSSG + NADPH_2 \xrightarrow{\text{Glutathionreduktase}} 2\,GSH + NADP^+$$

Im Doppelwellenlängenverfahren (340-400 nm) wurde die Extinktionsabnahme von $NADPH_2$ bei Raumtemperatur bis zum Endpunkt verfolgt. Der metaphosphorsaure Überstand des Leberhomogenats (20 % w/w) wurde für diesen Zweck mindestens 1:10 mit 0.01 N HCl verdünnt und ein 500 µl -Aliquot in den Test eingesetzt.

Testvolumen : 1,0 ml
Testkonzentrationen: 100 mM KP_i, pH 7.2
2,5 mM EDTA
100 µM $NADPH_2$
4 µg Glutathionreduktase

Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve.

3.2.8. Bestimmung der Serumtransaminasen

Die Aktivität der Serumtransaminasen Glutamat-Oxalacetat- und Glutamat-Pyruvat-Transaminase wurde nach BERGMEYER [54] im Plasma der Versuchtiere bestimmt.

Hierzu wurde das durch Herzpunktion gewonnene Blut heparinisiert (~ 90 IE/ml), die Erythrozyten abzentrifugiert (1 Min. Eppendorfzentrifuge) und 10 - 20 µl des Plasmas in den Test eingesetzt.

3.2.9. Plasma-Vitamin-E-Bestimmung

Plasma-Vitamin E wurde nach einer Methode von BIERI [55], modifiziert nach SEELY und BURK (persönliche Mitteilung), bestimmt.

500 µl Blutplasma wurden mit 1 ml absolutem Äthanol gut geschüttelt und 2 mal mit je 3 ml n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanphasen wurden dann bei 40°C unter N_2 zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 2 ml einer äthanolischen 0.02 %igen Bathophenanthrolin-Lösung versetzt.

Zu 1 ml dieser Lösung wurden 100 µl einer äthanolischen 0.03 %igen $FeCl_3$-Lösung hinzupipettiert und die Extinktionszunahme bei 534 nm nach 2 Minuten gegen einen Reagentienleerwert gemessen. Die Eichung erfolgte mit einer Vitamin-E-Standardlösung.

3.2.10. Bestimmung der Aktivität der selenhaltigen Glutathionperoxidase in Leber und Blut

Die Aktivität der Se-GSH-POD im Blut wurde nach einer von GÜNZLER [56] vorgeschlagenen gekoppelten Testmethode bestimmt.

Zur Bestimmung der GSH-POD in Mäuseleber wurde ein 20%iges (w/w) Leberhomogenat in Puffer (MOPS 50 mM, pH 7.0) hergestellt, 1 : 10 mit Puffer verdünnt und 50 µl in den Test [56] eingesetzt.

3.2.11. Differenzierung zwischen selenhaltiger und nicht-selenhaltiger Glutathionperoxidase

Durch Substraktion der Cumolhydroperoxid-sensitiven GSH-POD-Aktivität (Summe von Se- und nicht-Se-GSH-POD) von der H_2O_2 bzw. t-BHP-sensitiven Aktivität (Se-GSH-POD) erhält man die Aktivität der nicht-selenhaltigen Glutathionperoxidase(n).

3.2.12. Bestimmung der Glutathionreduktaseaktivität in der Mäuseleber

Glutathionreduktase katalysiert die Reduktion von oxidiertem Glutathion zu reduziertem Glutathion unter Oxidation eines Äquivalents $NADPH_2$:

Die Messmethode beruht auf der Bestimmung der Extinktionsabnahmegeschwindigkeit von $NADPH_2$ bei 366 nm.

50 µl eines entsprechend verdünnten Leberhomogenats in MOPS-Puffer (pH 7.0, 50 mM) werden in einem Gesamtvolumen von 700 µl 5 Minuten bei 37°C in der Testlösung vorinkubiert. Zusammensetzung der Inkubationslösung:

173 mM TRAP-Puffer
0.8 mM EDTA
1 µM FAD
0.27 mM $NADPH_2$

Die Reaktion wird mit 50 µl einer 15 mM GSSG-Lösung gestartet.
Die Aktivitätsberechnung erfolgt mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $NADPH_2$ bei 366 nm

$$\varepsilon = 3{,}4 \ \frac{\mu Mol}{cm^2}$$

3.2.13. Bestimmung der Glutathion-S-Transferaseaktivität in der Mäuseleber

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen wurde nach HABIG und Mitarbeitern [57] mit den Substraten 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol bzw. Ethacrynsäure bestimmt.

Folgende Veränderungen der Substratkonzentrationen in der Testlösung wurden vorgenommen:

Test mit 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol: 5 mM Glutathion
Test mit Ethacrynsäure : 300 µM Ethacrynsäure
: 375 µM Glutathion

3.2.14. Die Aktivität der Superoxiddismutase in der Mäuseleber

Die SOD-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach der Methode von MISRA und FRIDOVICH [58].

3.2.15. Bestimmung der Katalaseaktivität in der Mäuseleber

Die von HÜBL und BRETSCHNEIDER [59] beschriebene Titanylsulfat-Methode zur Bestimmung der Katalase in Blut, Serum und Harn wurde für die Leber wie folgt modifiziert:

Testlösung

20 g Titanylsulfat/TiO_2 wurden in 500 ml 1 N H_2SO_4 aufgeschlemmt, abfiltriert und ca. 1 Woche kühlgestellt, bis das restliche TiO_2 sedimentiert war; kurz vor Gebrauch wurde nochmals filtriert.

H_2O_2-Lösung: 3 mM (1 mM EDTA)

Homogenat

Die Leber wurde in 50 mM MOPS-Puffer (pH 7.0, 0.5 % Triton X-100) homogenisiert, ca. 2 Minuten in der Kälte ultrabeschallt und passend mit Puffer verdünnt. Dann wurde 2 Min. zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge) und ein Aliquot des klaren Überstandes in den Test eingesetzt.

Test	:	500 µl - x µl	Puffer
		Y µl	Probe
Start	:	500 µl	H_2O_2-Lösung (nach 3 bzw. 6 Minuten)
Stop	:	500 µl	$TiOSO_4$-Lösung ⟶ E_t
Referenz:		500 µl	Puffer
		500 µl	H_2O_2
		500 µl	$TiOSO_4$-Lösung ⟶ E_o
Blank	:	500 µl	Puffer
		500 µl	H_2O, 1 mM EDTA
		500 µl	$TiOSO_4$-Lösung

Das Prinzip dieses Testverfahrens beruht auf der Bildung eines farbigen Reaktionsproduktes von nichtumgesetztem H_2O_2 mit $TiOSO_4$ nach der Reaktionszeit t bei gleichzeitiger Säuredenaturierung der Katalase. Der Farbkomplex wird bei 410 nm gegen den Blank gemessen.

Berechnung der Kataläseaktivität K :

$$K = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{E_0}{E_t}$$

E_0 = Extinktion der Ausgangs-H_2O_2-Lösung (Referenz)

E_t = Extinktion der Probe nach der Reaktionszeit t

K = ist ein Maß für die Katalaseaktivität und steht bei kurzen Reaktionszeiten und relativ hohen Enzymkonzentrationen über

$$k = 2{,}303 \cdot K$$

mit der Geschwindigkeitskonstante k einer Reaktion erster Ordnung in Beziehung.

3.2.16. Bestimmung von Cytochrom P-450 in Mäuselebermikrosomen

Die quantitative Bestimmung von Cytochrom-P-450 erfolgte nach der Methode von OMURA und SATO [60].

3.2.17. Proteinbestimmung

Protein wurde nach LOWRY [61] bestimmt.

3.2.18. Bestimmung des Fettsäuremusters in Mäuseleberextrakten

Extraktion

Notwendige Reagenzien:

Chloroform/Methanol	(2 : 1)
Tertiär-Butylhydroxytoluol	(0.005 %)
Magnesiumchloridlösung	(0.034 % in H_2O)
Kaliumhydroxidlösung	(0.5 N in Methanol)
n-Hexan oder n-Heptan	
Na Cl - Lösung	(gesättigt)
Bortrifluorid	(14 % in Methanol)

Extraktionsverfahren

0.5 g Gewebe wurden mit 10 ml $CHCl_3$/MeOH-Lösung in der Kälte homogenisiert und dieser Rohextrakt über ein Faltenfilter filtriert.

5 ml des Filtrats wurden mit 1 ml $MgCl_2$-Lösung geschüttelt, dann 5 Minuten in der Hettichzentrifuge zentrifugiert und die wässrige Oberphase verworfen. Dieser Vorgang wurde mit 2 ml $MgCl_2$-Lösung noch einmal wiederholt.

2 ml des gereinigten Extraktes wurden nun unter Stickstoff bei Raumtemperatur eingedampft. Zur Verseifung der Lipide wurde der Rückstand in 2 ml methanolischer KOH 15 Minuten unter Rückfluß bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Zu dieser heißen Lösung wurde dann 2 ml methanolisches Bortrifluorid zupipettiert und weitere

5 Minuten erhitzt.

Nachdem dieses Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, konnten die Fettsäuremethylester mit n-Hexan bzw. n-Heptan extrahiert werden. Zur besseren Phasentrennung wurden einige ml gesättigte Na Cl -Lösung hinzugegeben. Ein Aliquot des Fettsäuremethylestergemisches wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

0.5-1 µl dieser Lösung wurden dann im Gaschromatographen analysiert.

Identifiziert wurden die einzelnen Fettsäuren anhand der Retentionszeiten eines Standardgemisches und quantifiziert als Flächenprozente des Gesamtchromatogramms. Die Analyse erfolgte isotherm bei 185°C auf einer 2 m langen Polyäthylenglykolsuccinat-Säule (PEGS) Ø 4 mm

Gasflüsse :	synthetische Luft	500 ml/min
	Wasserstoff	30 ml/min
	Stickstoff (Trägergas)	30 ml/min
Detektor :	Flammenionisationsdetektor	

Die Messdaten wurden, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwerte ± Standardabweichung aufgeführt.

4. R E S U L T A T E

4.1. Das Kohlenwasserstoffmuster in der Ausatmungsluft pharmakabelasteter Mäuse

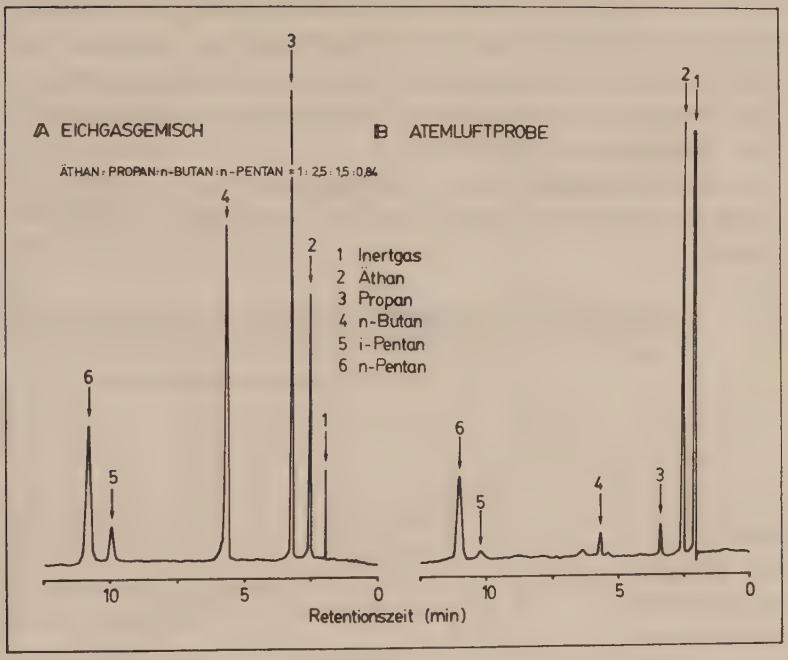


Abb.: 1

A : Gaschromatogramm eines Standardgemisches niederer Kohlenwasserstoffe im 0.6-1 vpm Bereich

B : Gaschromatogramm der Ausatmungsluft einer gehungerten Paracetamol-belasteten männlichen Maus
Dosis 500 mg/kg, 3 Stunden nach Applikation

Abbildung 1 zeigt, daß abgeatmete Kohlenwasserstoffe von Einzeltieren quantitativ getrennt und bestimmt werden können. Die methodische Grundlage für die weiteren Versuche war damit erarbeitet.

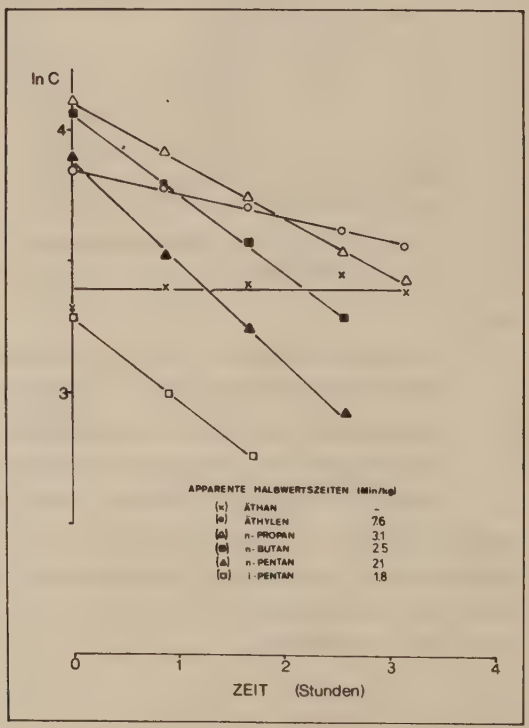
Abbildung 1 A zeigt das Gaschromatogramm eines Standardgemisches niederer Kohlenwasserstoffe im Konzentrationsbereich von 27-44 pMol/ml Gasprobe.

Abbildung 1 B zeigt das typische Verteilungsmuster abgeatmeter Kohlenwasserstoffe bei Arzneimittel-induzierter Lipidperoxidation in vivo bei der Maus.

Die qualitative Zusammensetzung des Kohlenwasserstoffgemisches in den Atemproben ist unabhängig von der Art des applizierten Arzneimittels.

Die Hauptkomponente jedes Chromatogrammes ist Äthan, gefolgt von n-Pentan, n-Butan, Propan und Spuren von iso-Pentan.

4.2. Metabolismus verschiedener niederer Kohlenwasserstoffe in vivo



Metabolismus von Kohlenwasserstoffen in vivo im Bereich von 0.5-1 vpm bei unbehandelten männlichen Mäusen.

Männliche unbelastete Mäuse wurden in einem geschlossenen System einem hochverdünnten Kohlenwasserstoffgemisch ausgesetzt. Der Konzentrationsbereich dieses künstlichen Gemisches entsprach größenordnungsmäßig der bei maximaler Lipidperoxidation in vivo beobachteten Kohlenwasserstoffabatmung.

Mit Ausnahme von Äthan verringerte sich die Konzentration der übrigen Komponenten innerhalb der Beobachtungszeit mit einer Kinetik erster Ordnung. Eine meßbare Äthanmetabolisierung wurde nicht beobachtet, während sich die Halbwertzeiten von Äthylen bis n-Pentan entsprechend steigender Molekülgröße drastisch verringerten (7,6 - 1,8 Min/kg).

4.3. Die Variabilität des Gesamtglutathiongehalts der Mäuseleber in Abhängigkeit von Hunger, Sucrosediät und Futter

Paracetamol-induzierte LPO bei Mäusen tritt signifikant nur dann in Erscheinung, wenn das Leberglutathion zuvor durch eine 1-2 tägige Hungerperiode auf etwa die Hälfte abgesunken ist [2]. Als eine Ursache für diesen Effekt auf den Glutathionstatus der Leber wird das Fehlen von alimentärem Cystein als Biosynthesevorstufe für Glutathion diskutiert [62].

Da die Konsequenzen der hypoglykämischen Stoffwechsellage im Hunger für den tierischen Organismus einerseits kaum einschätzbar sind und andererseits die Aggressionsschwelle der Tiere im Hunger stark herabgesetzt ist, wurde die Hungerperiode durch Verabreichung von 10 % Sucrose im Trinkwasser ersetzt.

Der Einfluß der Sucrosediät auf den Leberglutathionspiegel in der Maus zeigt Abbildung 3.

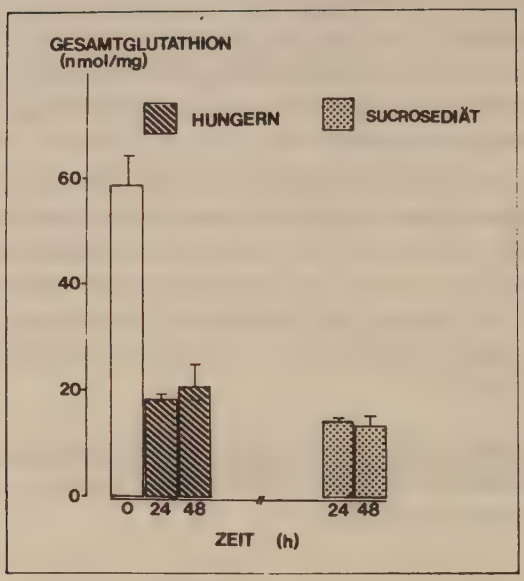


Abb.3: Der Einfluß von Hunger und Sucrosediät auf den Gesamtglutathionspiegel normalgefütterter männlicher Mäuse.

Innerhalb einer 24-stündigen Hungerperiode sinkt der Leberglutathiongehalt einer normal ernährten Maus auf rund 35 % des Ausgangswertes ab (Abb.3 linke Seite), eine Verlängerung der Hungerperiode um weitere 24 Std. führt zu keiner weiteren Verringerung.

Der Ersatz des Futters durch 10 % Sucrose im Trinkwasser führt innerhalb von 24 bzw. 48 Std. zu einer 70 %igen Verarmung an Leberglutathion (Abb.3 rechte Seite).

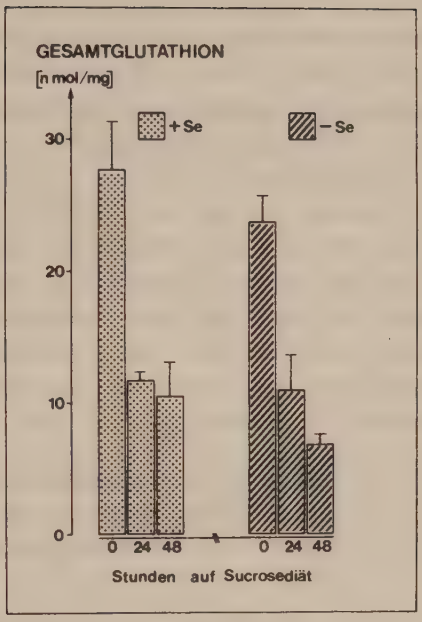


Abb.4: Gesamtglutathionabnahme in der Mäuseleber nach 1-2 tägiger Sucrosediät bei Selen-Mangel- und Selen-supplementierten männlichen Mäusen.

Abbildung 4 zeigt die Sucrosediät-bedingte Abnahme des Gesamtglutathions in den Lebern von Selen-Mangel- bzw. Selen-supplementierten Mäusen. Nach 48 Stunden ist der GSH-Spiegel bei Selen-Mangel-Mäusen auf 30 %, bei den Selen-supplementierten Tieren auf 40 % des Ausgangslevels abgesunken.

Die Zusammensetzung des Futters, insbesondere der Gehalt an Cystein oder Methionin scheint die Absolutkonzentration des Gesamtglutathions in der Leber zu bestimmen. Ein Vergleich der GSH-Spiegel von normal gefütterten Tieren (Abb.3) mit den GSH-Werten von Selen-Mangel- bzw. Selen-supplementierten Tieren (Abb.4) verdeutlicht folgendes:

Mit rund 60 nMol Gesamtglutathion pro mg Leberprotein weisen Mäuse auf Normalfutter einen etwa doppelt so hohen GSH-Spiegel auf als Selen-Mangel bzw. Selen-supplementierte Tiere (24 bzw. 28 nMol GSH/mg Protein).

Dies entspricht einem relativen Konzentrationsverhältnis von 1 : 0.4 : 0.5. Nach 48-stündiger Sucrosegabe verändert sich diese Relation zu 1 : 0.5 : 0.8, d.h. der Sucrosediät-insensitive Teil des Leberglutathions wird durch die Zusammensetzung des Futters beeinflusst.

Da die folgenden Experimente z.T. mit gehungerten Tieren, zum größeren Teil aber mit Sucrose-gefütterten Tieren gemacht wurden, wird auf die in den Legenden aufgeführte Bezeichnung "gehungert" und "Sucrose-gefüttert" besonders hingewiesen.

4.4. Der Einfluß verschiedener Induktoren des mischfunktionellen Monooxygenasesystems der Leber auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo

Vorbehandlung	Dosis Paracetamol (mg/kg)	Äthan Abatmung (nmol/kg × 4 hrs)	STEIGERUNG	N	M
—	300	30	—	5	0
PHENOBARBITAL	300	300	10	6	0
BENZO(α)PYREN	300	670	22	4	1
METHYLCHOLANTHREN	300	850	28	4	1
—	500	600	20	8	6

N = Anzahl der Tiere

M = Sterblichkeitsrate (=Anzahl der Tiere, die innerhalb von 4 Stunden starben)

Tab.1: Der Einfluß verschiedener Induktoren des Arzneimittelmetabolisierenden Monooxygenasesystems auf die Äthanexhalation "gehungerter" Mäuse nach 300 mg/kg Paracetamol.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, steigert Phenobarbital die Paracetamol-induzierte LPO um einen Faktor von 10, Benzpyren und 3-Methylcholanthren verstärken die Äthanexhalation 22-fach und sogar 28-fach. Die Äthanproduktion von BP- und MC-induzierten Tieren bei einer subtoxischen Paracetamoldosis von 300 mg/kg ist sogar höher als die Äthanbildung nach einer nahezu letalen Dosis von 500 mg/kg bei nicht-induzierten Mäusen.

Die Letalitätsrate bei den maximal belasteten, nicht-induzierten Tieren ist auffällig größer als bei den subtoxisch-belasteten induzierten Mäusen, obwohl die Äthanexhalation sogar verstärkt ist.

Der Cytochrom-P-450- bzw. Cytochrom-P-448-Gehalt isolierter Mikrosomen von PB-, BP- und 3-MC-induzierten Mäusen ist 2,5 - 3 fach höher als in nicht-induzierten Kontrollen (1,7 ± 0.5 nMol Cytochrom-P-450/mg Protein im Vergleich zu den Kontrollen: 0.69 nMol/mg Protein).

4.5. Der Einfluß verschiedener Hemmer des mikrosomalen Monooxygenasesystems auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo

Um eine signifikante Hemmung der Äthanexhalation bei subtoxisch-belasteten Tieren durch die verschiedenen Inhibitoren messen zu können, wurden alle Tiere vorher induziert.

Induktor	Inhibitor		Äthan Abatmung nmol/kg × 4 hrs	Äthan Abatmung % der Kontrolle	N	M
PHENOBARBITAL	—		300	100	6	0
	DIÄTHYLDITHIOCARBAMAT	(100 mg/kg)	15	5	2	0
	SKF - 525 A	(50 mg/kg)	21	7	5	0
	METYRAPON	(150 mg/kg)	27	9	2	1
	PYRAZOL	(100 mg/kg)	27	9	2	1
	PERFLUORHEXAN	(200 mg/kg)	183	61	2	2
	α - NAPHTHOFLAVON	(100 mg/kg)	21	7	7	0

Tab.2: Einfluß verschiedener Inhibitoren des Cytochrom-P-450-Systems auf die Äthanbildung bei "gehungerten" induzierten Mäusen nach 300 mg/kg Paracetamol.

N = Anzahl der Tiere
M = Sterblichkeitsrate (Zahl der Tiere, die innerhalb von 4 Stunden starben)

Vier von fünf Cytochrom-P-450-gerichteten Inhibitoren hemmen die Äthanexhalation nach einer subtoxischen Dosis von Paracetamol um mehr als 90 %, während die hemmende Wirkung von Perfluorhexan auf die in-vivo-LPO weniger stark ausgeprägt ist.

Auch α-Naphthoflavon, das als spezifischer Hemmer von Cytochrom-P-448 bekannt ist, inhibiert bei PB-induzierten Tieren die Paracetamol-induzierte Äthanexhalation um mehr als 90 %.

Induktor	Inhibitor		Äthan Abatmung nmol/kg×4hrs	% der Kontrolle	N	M
BENZO(α)PYREN	—		670	100	4	1
	α-NAPHTHOFLAVON	(100 mg/kg)	20	3	4	2
	SKF 525 A	(50 mg/kg)	780	116	2	1
METHYLCHOLANTHREN	—		850	100	4	1
	α-NAPHTHOFLAVON	(100 mg/kg)	480	57	4	2
	α-NAPHTHOFLAVON	(150 mg/kg)	160	19	2	2

Tab.3: Der Einfluß des Cytochrom-P-448-Hemmers α-Naphthoflavon auf die in-vivo-LPO nach einer subtoxischen Paracetamoldosis bei BP- und 3-MC-induzierten, "gehungerten" Mäusen.

N = Zahl der Tiere
M = Sterblichkeitsrate innerhalb von 4 Stunden

Der vorwiegend Cytochrom-P-448 gerichtete Inhibitor α-Naphthoflavon hemmt die Paracetamol-induzierte LPO bei

BP-induzierten Mäusen um über 90 % und in höherer Konzentration um über 80 % bei 3-MC-induzierten Tieren. Das Cytochrom-P-450-spezifische SKF-525 A zeigt dagegen keine Hemmwirkung.

4.6. In-vivo- und in-vitro-LPO durch Intoxikation mit verschiedenen Pharmaka in Abhängigkeit vom Selenstatus

Induktion und Hemmung des mischfunktionellen Monooxygenasesystems modulieren die Paracetamol-induzierte LPO bei Mäusen (Tab.1-3), d.h. die Aktivierung von Paracetamol in der Biotransformationsphase I ist eine notwendige Voraussetzung für diesen Prozess.

Andererseits wird signifikante Äthanexhalation nur dann beobachtet, wenn das Leberglutathion, der Konjugationspartner aktiver Metabolite in der Biotransformationsphase II, zuvor durch Hunger oder Sucrosediät stark vermindert wurde.

Zur Lösung der Frage, inwieweit GSH-verbrauchende Stoffwechselprozesse eine Rolle bei der Arzneimittel-induzierten LPO spielen, wurden folgende Experimente durchgeführt:

1) Pharmaka, die die Phase-I-Biotransformation durchlaufen, deren Metaboliten aber nicht mit GSH konjugiert werden, wurden in vivo studiert, wobei die Phase II durch vorherige Verabreichung von DEM simuliert wurde.

2) Die Rolle der GSH-POD-Reaktion wurde durch Modulation der Enzymaktivität mittels einer Selen-Mangeldiät untersucht.

In einer ersten Versuchsreihe wurden Sucrose-gefütterte Mäuse mit jeweils 100 mg/kg Paracetamol, Aminoantipyrin oder Äthylmorphin belastet ohne zusätzliche GSH-Absenkung durch DEM.

Weder bei Selen-Mangel- noch bei Selen-supplementierten Tieren konnte eine höhere Äthanproduktion oder -bildung

als bei unbehandelten Kontrollen festgestellt werden.

DEM-Vorbehandlung dagegen veränderte die Situation vollkommen:

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 4 und zur Verdeutlichung graphisch in Abbildung 5 dargestellt:

	Äthan Abatmung nmol/kg·hr				Malondialdehyd pmol/mg Protein				GSH + 2 GSSG nmol/mg Protein			
	Se^-	N	Se^+	N	Se^-	N	Se^+	N	Se^-	N	Se^+	N
DEM (400mg/kg)	4.9 ± 4.2	4	1.9 ± 1.4	6	164 ± 22	4	154 ± 20	6	6.5 ± 1.7	4	7.3 ± 1.3	6
+ PARACETAMOL (100 mg/kg)	305 ± 93	5	67 ± 41	4	426 ± 160	5	354 ± 81	4	1.2 ± 0.5	5	2.6 ± 2	4
+ AMINOPYRIN (100 mg/kg)	301 ± 55	3	4.8 ± 0.7	3	436 ± 25	3	130 ± 28	3	0.4 ± 0.2	3	4.9 ± 0.9	3
+ ÄTHYLMORPHIN (100 mg/kg)	285 ± 87	4	1.7 ± 1.3	7	513 ± 44	3	145 ± 30	7	0.4 ± 0.1	3	8.3 ± 1	7

Tab.4: Äthanbildungsrate, Malondialdehyd und Gesamtglutathion bei Selen-Mangel- und Selen-supplementierten, Sucrose-gefütterten Mäusen, vorbehandelt mit 400 mg/kg DEM und belastet mit 100 mg/kg Paracetamol, Aminoantipyrin oder Äthylmorphin.

N = Anzahl der Tiere

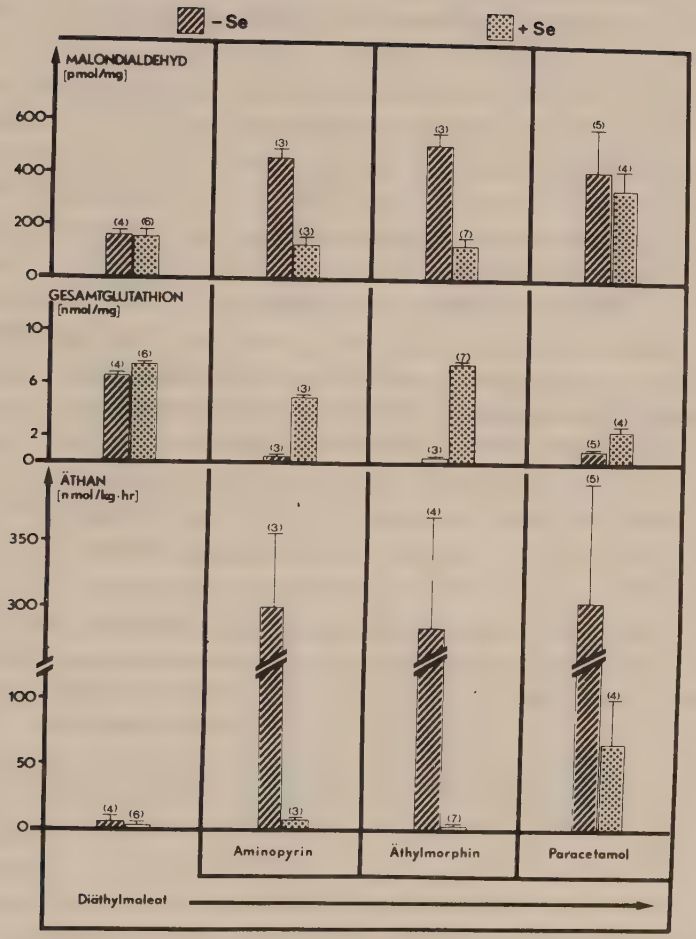


Abb.5: Legende siehe Tabelle 4

Zahlen in Klammern : Anzahl der Tiere
schraffierte Säulen: Selen-Mangel-Tiere
punktierte Säulen: Selen-supplementierte Tiere

DEM-Vorbehandlung führt bei Sucrose-gefütterten und Selen-supplementierten Mäusen zu einer zusätzlichen Absenkung des Leberglutathions:

10.5 ± 2.7 nMol/mg Protein (n=3, Abb.4 linke Seite) zu
7.3 ± 1.6 nMol/mg Protein (n=6, Tab.4).

Bei Selen-Mangeltieren verringert sich der Sucroseendwert des Leberglutathions nach DEM nicht signifikant:
6.9 ± 0.8 nMol/mg Protein (n=3, Abb.4 rechte Seite)
im Vergleich zu
6.5 ± 1.7 nMol/mg Protein (n=4, Tab.4).

Unabhängig vom Selenstatus führt DEM allein weder zu signifikanter Äthanexhalation noch zu erhöhter MDA-Bildung in den Lebern dieser Tiere. Weiterhin wirkte DEM im Beobachtungszeitraum von 4 Stunden nicht letal.

Nach zusätzlicher Belastung mit geringen Dosen verschiedener Pharmaka verhielten sich die Selen-Mangeltiere völlig anders als die Selen-supplementierten Kontrollen:

Tab.4 und Abb.5 illustrieren, daß Selenmangeltiere mit allen drei Pharmaka sehr große Äthanmengen abatmen. Die Äthanbildungsrate war höher als die bei normal gefütterten Tieren nach einer letalen Paracetamoldosis beobachtete Rate und sogar größer als die Rate bei induzierten Tieren nach einer subletalen Dosis (Vergleich in Tabelle 1). Alle Tiere der Selenmangelgruppe starben innerhalb der ersten zwei Stunden.

Bei den Selen-supplementierten Kontrolltieren wurde nur nach Paracetamol signifikante LPO beobachtet, quantitativ rund ein Fünftel der Äthanmenge der Selenmangelgruppe. In dieser Gruppe starben 2 von 4 Tieren innerhalb von $3^1/_2$ Stunden, während alle Aminoantipyrin- und Äthylmorphin-belasteten Tiere überlebten.

Die Äthanexhalation der Arzneimittel-belasteten Selenmangelgruppe entsprach rund dem 60-fachen der entsprechen-

den DEM-Kontrollgruppe, während nur 2.5-3 mal mehr MDA in den Lebern nachgewiesen werden konnte.

Diese Disproportionalität findet man auch bei den Paracetamol-belasteten Selen-supplementierten Tieren. Obwohl rund 10 mal mehr Äthan im Vergleich zu den DEM-behandelten Kontrollen abgeatmet wurde, erhöht sich das MDA nur um das Doppelte.

Der GSH-Verlust in den Lebern der Arzneimittel-belasteten Selenmangelgruppe betrug nach Paracetamol ca. 80 %, nach Aminoantipyrin und Äthylmorphin jeweils 94 % des Ausgangswertes.

Rund 75 % des Leberglutathions verloren Paracetamol-belastete Selen-supplementierte Mäuse, Äthylmorphin blieb ohne Effekt auf den GSH-Spiegel, während nach Aminoantipyrin ca. 33 % des Glutathions fehlten, obwohl keine signifikante LPO stattgefunden hatte.

Die Serumtransaminaseaktivität wurde post-mortem oder bei den überlebenden Tieren nach 4 Stunden bestimmt.

Der Basalwert für Glutamat-Oxalacetat-Transaminase bei völlig unbehandelten Tieren liegt bei 124 $\pm$ 48 mU/ml Plasma (N=30) und für Glutamat-Pyruvat-Transaminase bei 73 $\pm$ 33 mU/ml Plasma (N=30).

Hunger, Sucrosediät oder Veränderungen im Selenstatus beeinflussen diesen Basalwert nicht signifikant. Bei den Selen-supplementierten Tieren stiegen die Serumtransaminaseaktivitäten nach Äthylmorphin- und Aminoantipyrin-Applikation nicht signifikant, während die Paracetamol-belasteten Selen-supplementierten Tiere und alle Arzneimittel-belasteten Selenmangeltiere extreme Transaminaseanstiege aufwiesen. (SGPT: 4 000 mU/ml, SGOT: 2 000 mU/ml).

Tabelle 5 zeigt einige zusätzliche Experimente mit Furosemid, einem Arzneimittel, welches in hohen Dosen ebenfalls Lebernekrosen hervorruft und Äthoxycumarin, einem

gängigen Substrat des Cytochrom-P-450-Systems.

	Dosis (mg/kg)	Äthan Abatmung (nmol/kg·hr)	N
SELEN - SUPPLEMENTIERT			
Furosemid	125	1.3 ± 0.6	3
Furosemid + DEM	125 + 400	4 ± 1	4
SELEN - MANGEL			
Furosemid	125	1.0 ± 0.4	5
Furosemid + DEM	125 + 400	13.3 ± 4.8	3
NORMALFUTTER, PHENOBARBITAL INDUZIERT			
Furosemid	125	1.7 ± 2.5	2
Furosemid + DEM	125 + 400	234 ± 95	3
Äthoxycumarin	200	4.0 ± 3.5	2
Äthoxycumarin + DEM	200 + 400	23 ± 17	3

Tab.5: Effekt von PB-Induktion, DEM-Vorbehandlung und Selenstatus auf die Furosemid- und Äthoxycumarin-induzierte LPO bei Sucrose-gefütterten Mäusen.

N = Anzahl der Tiere

Bei Selen-supplementierten Mäusen führt Furosemid zu keiner signifikanten LPO, auch wenn zuvor DEM verabreicht wurde (Selen-supplementiert).

Im Selenmangel hingegen führt Furosemid in Kombination mit DEM zu einer geringen, aber signifikanten LPO (Selenmangel).

Dieser Effekt ist bei PB-induzierten Tieren wesentlich höher. Ein qualitativ ähnliches Bild ergibt sich auch für Äthoxycumarin.

4.7. Fettsäuremuster in der Mäuseleber nach LPO

Die Äthanbildung in vivo wird auf den Zerfall polyungesättigter Fettsäuren der Linolensäure-Familie zurückgeführt. Da Linolensäure selbst nur etwa 1 % zum Gesamtfettsäuregehalt einer Mäuseleber beiträgt, verbleibt als einzige theoretisch denkbare Äthanquelle Docosahexaensäure. Pentan entsteht als Zerfallsprodukt von Arachidonsäure.

Stichprobenartig wurden aus Lebern belasteter und unbelasteter Tiere Lipidextrakte hergestellt und das Fettsäuremuster gaschromatographisch bestimmt.

Tabelle 6 gibt den Gehalt der LPO-sensitiven Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure in Form ihrer Flächenprozente wieder.

Flächenprozente Arachidonsäure	Flächenprozente Docosahexaensäure	Äthanproduktion (maximal) nMol/kg
3.2 ± 1 N=5	1.1 ± 1 N=5	>600
14.3 ± 1.7 N=5	10.5 ± 2.5 N=5	< 50

Tab.6: Gehalt von Arachidonsäure und Docosahexaensäure in Mäuseleberextrakten belasteter und unbelasteter Tiere

Unabhängig von der Art des Arzneimittels und der Vorbehandlung, die in vivo zu LPO führt, ist in den Lebern der Äthan-produzierenden Tiere die Docosahexaensäure um 90 % und die Arachidonsäure um knapp 80 % verringert.

4.8. Verschiedene Enzym- und Substratparameter der Mäuseleber in Relation zum Selenstatus

4.8.1. Glutathionperoxidase

Substrat	Glutathionperoxidase Aktivität (mU/mg Protein)		
	Se^- N=10	Se^+ N=8	Normalfutter N=16
WASSERSTOFFPEROXYD	14 ± 6	317 ± 53	180 ± 40
tert. BUTYLHYDROPEROXYD	14 ± 5	319 ± 61	170 ± 49
CUMOLHYDROPEROXYD	139 ± 20	478 ± 71	280 ± 51

Tab.7: Die GSH-POD-Aktivität der Mäuseleber bei verschiedenen Hydroperoxidsubstraten und in Abhängigkeit alimentärer Bedingungen:

Aktivität = mU/mg Protein
N = Anzahl der Tiere

Die H_2O_2-sensitive GSH-POD-Aktivität in der Mäuseleber (Wasserstoffperoxid Tab.7) sinkt im Selenmangel unter 5 % der Selen-supplementierten Kontrollen bzw. unter 8 % in Relation zu normal-gefütterten Tieren. Überraschenderweise findet man die gleichen GSH-POD-Aktivitäten auch mit dem organischen Hydroperoxid Tertiär-Butylhydroperoxid (t-BHP s.Tabelle). Im Gegensatz zur Ratte [42] scheint t-BHP kein Substrat der Nicht-Se-POD in der Maus zu sein. Bei Verwendung von Cumolhydroperoxid als Substrat (s.Tabelle) findet man sowohl bei den Selen-supplementierten als auch bei normal-gefütterten Tieren einen GSH-POD-Zuwachs von rund 50 %. Bei Selenmangeltieren entspricht die Cumolhydroperoxid-sensitive GSH-POD-Aktivität quantitativ diesem Zuwachs. Dies bedeutet einerseits, daß die Cumolhydroperoxid-sensitive GSH-POD-Aktivität im Selenmangel gleichbedeutend ist mit der Aktivität der nicht-selenhaltigen GSH-POD und andererseits, daß diese Aktivität unabhängig vom Selenstatus ist.

4.8.2. Gesamtglutathion, oxidiertes Glutathion und Glutathionreduktase

		Selen Mangel	N	Selen supplementiert	N	Normalfutter	N
GSH + 2 GSSG	(nmol/mg Protein)	23.8 ± 2	3	28 ± 4	3	61 ± 2	5
GSSG	(nmol/mg Protein)	0.4 ±0.2	3	0.6 ± 0.3	3	1.5 ±0.5	5
GLUTATHION REDUKTASE	(mU/mg Protein)	86.5 ± 4	6	68 ± 7	6	64 ± 10	6

Tab.8: Gesamtglutathion, GSSG und Glutathionreduktase in Abhängigkeit verschiedener alimentärer Bedingungen

N = Anzahl der Tiere

Wie schon erwähnt, beeinflußt die Zusammensetzung der Diät den Gesamtglutathion-Gehalt der Leber, dagegen ist er vom Selenstatus unabhängig.

Dies trifft ebenso für GSSG zu. Quantitativ ist GSSG in der Mäuseleber bei Selen-Mangel- und Selen-supplementierten Tieren mit weniger als 2 % und bei normalgefütterten Tieren mit ca. 2.5 % am Gesamtglutathion beteiligt.

4.8.3. Glutathion-S-Transferasen

Substrate	Se^-	N	Se^+	N	Normalfutter	N
A DINITROCHLORBENZOL	1.43±0.3	7	1.46±0.37	7	1.84 ± 0.4	17
B ETHACRYNSÄURE	87± 15	9	63± 15	9	120 ± 10	17

A: U/mg Protein B: mU/mg Protein

Abb.9: GSH-S-Transferase-Aktivität in der Mäuseleber in Relation zu Selenstatus und Futter
N = Anzahl der Tiere

Die verschiedenen GSH-S-Transferase-Aktivitäten in der Mäuseleber variieren mit der Art des Futters, sind aber vom Selenstatus weitgehend unabhängig.

4.8.4. Andere Parameter

		Se^-	Se^+	Normalfutter
PLASMA VITAMIN E	(µg/ml Serum)	2.0 (4*)	0.7 (4*)	0.3 (6*)
KATALASE	(mK/mg Protein)	531 ±180 (10)	385± 81 (10)	962±79 (5)
SUPEROXID DISMUTASE	(µg/mg Protein)	7.0 ± 1.0 (8)	6.1 ± 1.4 (14)	6.0±1.3 (19)

Tab.10: Plasma-Vitamin E, Katalase und Superoxiddismutase in der Maus in Relation zu Futter und Selenstatus

( )= Anzahl der Tiere + = vereinigte Proben

Der Plasma-Vitamin-E-Gehalt Selen-Mangel-ernährter Mäuse ist fast 3 mal so hoch wie bei den supplementierten Kontrollen und 6-7 mal höher als bei normalgefütterten Tieren.

Dies bedeutet, daß die gesteigerte Arzneimittelsensitivität von Selen-Mangel-Mäusen kein Vitamin-E-Effekt, sondern sicher ein Effekt des verminderten Selenstatus ist.

Die SOD-Aktivität ist vollkommen insensitiv gegenüber der Diät, während die Leberkatalase in Relation zur Art des Futters und auch innerhalb der einzelnen Kollektive starken Schwankungen unterliegt.

4.9. Der Einfluß von Propylthiouracil (PTU) auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation in vivo

PTU-Vorbehandlung über längere Zeit hemmt bei der Ratte die Bildung der Paracetamol-induzierten Lebernekrose und verhindert gleichzeitig das Absinken des Leberglutathions [63].

In einer weiteren Arbeit wurde nachgewiesen, daß PTU ein Inhibitor der GSH-S-Transferasen, speziell der GSH-S-Transferase B ist, welche es kompetitiv zu GSH und unkompetitiv zum elektrophilen Substrat hemmt [64]. Der Einfluß von PTU auf die Paracetamol-induzierte LPO in vivo bei der Maus zeigt Tabelle 11 :

	GSH-S-Transferasen (U/mg)		Leber GSH (nmol/mg)	Äthan Abatmung (nmol/kg·h)	N
	Ethacrynsäure	Dinitrochlorbenzol			
YLTHIOURACIL (170 mg/kg)	0.129 ± .004	1.6 ± 0.2	21.1 ± 3	14 ± 6	4
CETAMOL (400 mg/kg)	0.110 ± .018	1.6 ± 0.5	2.0 ± 1.1	60 ± 37	5
YLTHIOURACIL (170 mg/kg) + RACETAMOL (400 mg/kg)	0.173 ± .008	1.9 ± 0.3	2.7 ± 1.2	15 ± 7	5

Tab.11 : Der Einfluß von PTU auf die LPO in vivo bei Sucrose-gefütterten Mäusen nach 400 mg/kg Paracetamol auf den GSH-Gehalt und die Aktivität der GSH-S-Transferasen

DNCB = 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
PTU = 1 Stunde vor Paracetamol i.p.
N = Anzahl der Tiere

Paracetamol allein (400 mg/kg) führt zu erwartet hoher Lipidperoxidation und einer damit verbundenen GSH-Abnahme von über 90 % ausgehend vom Sucrosediät-Spiegel. Die GSH-S-Transferase-Aktivität in den LPO-geschädigten Lebern entspricht den Normwerten (siehe Tabelle 9, letzte Spalte).

PTU-Behandlung führt zu keiner LPO, noch zu veränderten GSH- und GSH-S-Transferasewerten.

PTU-vorbehandelte Tiere zeigen nach 400 mg/kg Paracetamol keine signifikante LPO. Der GSH-Spiegel dieser Tiere ist nicht wesentlich höher als bei Tieren, die nur mit Paracetamol behandelt wurden. Ebenso sind die GSH-S-Transferasen in den Lebern dieser Tiere leicht über den Normwert erhöht (Vergleich Tab.9, letzte Spalte).

4.10. Schwermetallintoxikation
Einfluß auf die Arzneimittel-induzierte LPO in vivo

Silberacetat, verabreicht über 2 Monate in Form einer 0.1-%igen Lösung im Trinkwasser führt zu einer drastischen Aktivitätsabnahme der selenhaligen GSH-POD in Leber und Erythrozyt bei der Maus.

Tabelle 12 demonstriert, daß die GSH-POD-Aktivität unter der Einwirkung von Ag^+ innerhalb von 60 Tagen auf weniger als 5 % des Ausgangswertes absinkt, vergleichbar mit der durch eine Selen-Mangeldiät induzierten Abnahme nach 30 Tagen (nicht gezeigt) bzw. 60 Tagen.

	Glutathionperoxidase Aktivität (% der Kontrolle)			
	Leber	N	Erythrozyten	N
$AgCH_3COO$, 20 Tage	26	11	60	11
$AgCH_3COO$, 60 Tage	5	8	22	8
Selen Mangel, 60 Tage	5	16	12	9

Tab.12: Die durchschnittliche GSH-POD-Aktivität in Leber und Erythrozyt bei der Maus. Einfluß von Ag^+ und Selen-Mangeldiät.

A : 0.1 % Ag Ac im Trinkwasser für 20 Tage
B : 0.1 % Ag Ac im Trinkwasser für 60 Tage
C : Selen-Mangeldiät für 60 Tage

100 % GSH-POD (Leber) = 180 mU/mg
100 % GSH-POD (Erythrozyt) = 120 mU/mg
} Substrat ist t-BHP

N = Anzahl der Tiere

Die Aktivitätsabnahme in den Erythrozyten Silberacetat-belasteter Tiere ist dagegen nicht so stark ausgeprägt im Vergleich zu Selen-Mangel-Tieren.

	Äthanabatmung (nmol/kg×h)	GOT (mU/ml	GPT Serum)	Gesamt-GSH (nmol/mg Protein)	Malondialdehyd (pmol/mg Protein)
PARACETAMOL (300 mg/kg)	31.1	5715	5010	8.2	178
in DMSO (2 ml/kg)	72.9	7502	9740	3.9	385
7age $AgCH_3COO$					
DMSO (2 ml/kg)	3.8	495	237	14.6	133
	3.7	252	191	12.6	113
PARACETAMOL (300 mg/kg)	33.76	3652	3846	0.7	1357
in DMSO (2 ml/kg)	18.29	7660	9326	0.8	772
	21.52	9674	12036	0.3	1509
AMINOANTIPYRIN (80 mg/kg)	5.4	1103	1315	26.3	540
in DMSO (2 ml/kg)	2.7	91	147	18.8	234
	3.2	135	188	12.3	200
AMINOANTIPYRIN (80 mg/kg)	5.5	150	540	1.76	165
in DMSO (2 ml/kg)	12.3	1331	1783	0.42	183
+ DEM (400 mg/kg)	4.3	136	201	0.42	154

Tab. 13 : Der Einfluß von Ag Ac auf die Paracetamol- und Aminoantipyrin-induzierte LPO und der Effekt auf die Serumtransaminasen, Gesamtglutathion und MDA.

Allen Tieren wurde 48 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Ag^+-Supplementation für 20 Tage steigert in vivo und in vitro die LPO nach einer subletalen Paracetamoldosis im Vergleich zu den Kontrollen etwa 5-fach und die GSH-Abnahme rund 10-fach. Die Serumtransaminasen beider Gruppen liegen extrem über den Normwerten.

Aminoantipyrin führt bei den Ag^+-belasteten Tieren nur nach vorheriger GSH-Depletion durch DEM zu signifikanter Äthanexhalation und einem extremen GSH-Verlust in der Leber. Serumtransaminasen und MDA-aktives Material in den Lebern sind dagegen nicht über die Werte der mit Aminoantipyrin behandelten Kontrollen erhöht.

	Äthan Abatmung (nmol/kg×h)	GOT (mU/mg Protein)	GPT (mU/mg Protein)	Gesamt-GSH (nmol/mg Protein)	Malondialdehyd (pmol/mg Protein)
60 Tage $AgCH_3COO$					
ÄTHYLMORPHIN (80 mg/kg)	3.2	1081	520	21.4	590
	2.8	770	20	12.1	374
DEM (400 mg/kg)	2	885	942	4.4	70
ÄTHYLMORPHIN (80 mg/kg) + DEM (400 mg/kg)	6.4	28216	11137	0.6	793
	8.3†	–	–	–	–
	14.6	23194	7843	0.7	1575
ÄTHYLMORPHIN (100 mg/kg)	2.5	107	33	17.6	135
	2.0	84	23	11.9	162
ÄTHYLMORPHIN (100 mg/kg) + DEM (400 mg/kg)	11.1	6634	11347	0.2	1085
	15.2†	–	–	–	–

Tab.14. : Der Einfluß von Ag Ac auf die Äthylmorphin-induzierte LPO und der Effekt auf die Serumtransaminasen, Gesamtglutathion und MDA.

Allen Tieren wurde 48 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde den Mäusen 60 Tage lang Ag^+ verabreicht, dann wurde mit Äthylmorphin (80 bzw. 100 mg/kg) belastet. Unter der Voraussetzung, daß durch vorherige DEM-Gabe das Leber-GSH abgesenkt wurde (ca 80 % Abnahme in Bezug auf den GSH-Spiegel nach 2-tägiger Hungerperiode) resultierte nach Äthylmorphin in vivo und in vitro signifikante LPO.

Extreme Serumtransaminase-Aktivitäten und GSH-Verluste begleiten diesen Prozess.

5. D I S K U S S I O N

5.1. Zur Natur und Signifikanz abgeatmeter Kohlenwasserstoffe

Die quantitative Bestimmung von abgeatmeten Kohlenwasserstoffen als Index der LPO stellte sich als sehr brauchbares Maß für diesen Prozeß dar [2,40,50,65,66].

Die empirische Korrelation zwischen Äthanbildung in vivo und LPO ist inzwischen theoretisch untermauert:

Äthan entsteht nach dieser Vorstellung durch thermalen β-Abbruch aus einem Alkoxyfettsäureradikal von Linolen- bzw. Docosahexaensäure. Peroxidative Zersetzung von Linol- und Arachidonsäuren führen entsprechend zu Pentan-Freisetzung. Damit ist zu erwarten, daß die Zusammensetzung der Lipide im Organismus Art und Ausmaß der abgeatmeten Kohlenwasserstoffe determiniert. Aus diesem Grunde wurde das Futter der in dieser Arbeit verwendeten Tiere mit polyungesättigten Lipiden angereichert und im Vitamin E-Gehalt etwas verringert, um einerseits genügend geeignetes Substrat für die LPO zur Verfügung zu stellen und andererseits die überkompensierte antioxidative Kapazität von Vitamin E einzuschränken.

Im Gaschromatogramm der Atemprobe einer Paracetamol-belasteten Maus (Abb.1) erscheinen außer den Hauptkomponenten Äthan und n-Pentan nicht unerhebliche Mengen von n-Butan und Spuren von iso-Pentan und Propan. Der Ursprung der letztgenannten Gase ist nicht geklärt. Propan tritt generell im Gaschromatogramm bei behandelten und unbehandelten Mäusen auf und korreliert nicht signifikant mit der Äthan- oder Pentanbildung. Deshalb ist anzunehmen, daß Propan kein Zerfallsprodukt peroxidierter Lipide darstellt.

N-Pentan wird im Verlauf der Arzneimittel-induzierten LPO entsprechend zu Äthan in erheblichen Mengen abgeatmet.

Andererseits metabolisiert das Versuchstier das Pentan in seiner Atematmosphäre mit einer Halbwertszeit von ~ 1.8 Min/kg (Abb.2). Dies bedeutet, daß die zu jedem Zeitpunkt messbare Pentankonzentration eine Resultierende aus abgeatmetem und wieder metabolisiertem Pentan darstellt. Dagegen wird Äthan innerhalb des untersuchten Zeitintervalls nicht signifikant metabolisiert.

Die Äthanbildung ist somit ein qualitativ und quantitativ sinnvoller Parameter für LPO in vivo.

5.2. Endogene Beeinflussung des Glutathiongehalts der Mäuseleber

Eine notwendige Voraussetzung für das Auftreten Paracetamol-induzierter LPO in vivo bei der Maus ist die vorherige Absenkung des Leberglutathions [2]. Dies wird unter anderem dadurch erreicht, daß den Tieren 48 Stunden vor Versuchsbeginn die Nahrung entzogen wird. Die Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäuren Cystein oder Methionin determiniert die Geschwindigkeit der Glutathion-de-novo-Synthese und damit den Gesamtglutathion-Gehalt der Leber. Außer substratlimitierter GSH-Biosynthese beobachteten TATEISHI und HIGASHI bei der Ratte [62] im Hunger auch einen beschleunigten GSH-Abbau, den sie auf eine im Hunger erhöhte γ-GT-Aktivität zurückführten. Aus Markierungsversuchen schlossen HIGASHI und Mitarbeiter [67] auf die Existenz zweier GSH-Pools in der Rattenleber, ein "labiler" mit einer Halbwertzeit von 1.7 Stunden, der relativ schnell abgebaut werden kann und somit Cystein zur Verfügung stellt und ein "stabiler" GSH-Pool mit einer Halbwertszeit von 28.5 Stunden, der unter anderem auch als Cysteinspeicher diskutiert wird [68]. LAUTERBURG und Mitarbeiter [69] zeigten ebenfalls über Markierungsversuche, daß im Hunger ein gesteigerter GSH-Umsatz stattfindet, die Existenz zweier verschiedener GSH-Pools konnten diese Autoren allerdings nicht bestätigen.

Wie Abb.3 verdeutlicht, läßt sich der nach 24-stündiger Hungerperiode erreichte GSH-Wert durch fortgesetzten Nahrungsentzug nicht weiter verringern. Nimmt man an, daß dieser zeitliche GSH-Abfall exponentiell verläuft, so entspricht die Halbwertszeit des Hunger-sensitiven GSH-Pools in der Mäuseleber größenordnungsmäßig der Halbwertszeit des "labilen" Pools in der Ratte.

Ein qualitativ ähnlicher Effekt auf den GSH-Spiegel wird durch Verabreichung einer reinen Sucrosediät über 24 Std. erreicht. Hierbei sinkt das Leber-GSH auf rund 30 % der ursprünglichen Konzentration ab. Der Vorteil dieser Methode für das hier verwendete experimentelle Modell liegt darin, daß einerseits hormonelle oder andere metabolische Veränderungen in Folge der hypoglykämischen Stoffwechsellage im Hungerzustand vermieden werden und andererseits die dadurch erhöhte Aggressivität der Tiere herabgesetzt wird. Die absolute Konzentration des Leberglutathions ist in Bezug auf die Art des verabreichten Futters starken Schwankungen unterworfen (Vgl. Abb.3 u. 4) .
Ausgehend von unterschiedlichen, alimentär bedingten GSH-Konzentrationen in den Lebern der einzelnen Tiergruppen führt Hunger oder Sucrosediät zu entsprechend unterschiedlichen GSH-Endkonzentrationen. Folgt man den Überlegungen von HIGASHI und Mitarbeitern so wird die Kapazität des "labilen" und auch des "stabilen" GSH-Pools in der Mäuseleber unter anderem auch durch die Art des Futters determiniert. Dagegen werden diese hypothetischen Pools vom Selenstatus nicht beeinflußt (Abb.4).

5.3. Die Rolle des mischfunktionellen Monooxygenasesystems

Ein entscheidender Faktor für die Paracetamol-induzierte LPO in-vivo ist die Aktivität des Arzneimittel-metabolisierenden Monooxygenasesystems der Leber. Wie aus den Experimenten (Tab.1) eindeutig hervorgeht, wird durch Induk-

tion des Monooxygenasesystems die Paracetamol-induzierte LPO erheblich gesteigert, dies bei einer Paracetamoldosis, die ohne Induktion weder zu LPO [2] noch zu signifikanter Proteinbindung führt [11,24].

Die Phenobarbital-induzierte Form des mischfunktionellen Monooxygenasesystems, das Cytochrom-P-450, katalysiert die Hydroxylierung, O- und N-Desalkylierung, Desaminierung oder N-Oxidation verschiedenster Arzneimittel. Durch Induktion dieses Cytochromsystems wird die Paracetamol-induzierte Äthanexhalation mehr gesteigert als die induktionsbedingte Konzentrationszunahme der Enzyme selbst. Dies ist noch stärker ausgeprägt bei BP- oder 3-MC induzierten Tieren. BP und 3-MC induzieren eine besondere Form des mischfunktionellen Monooxygenasesystems, das Cytochrom-P-448, das unter anderem für die Epoxidierung polyzyklischer Kohlenwasserstoffe verantwortlich ist.

Die Oxidation von Paracetamol über das Cytochrom-P-448-System führt zu einer rund 30-fach höheren LPO in vivo im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollen, obwohl die photometrisch meßbare Cytochrom-Menge nur um den Faktor 2-3 angestiegen ist. Dies berechtigt zu der Vermutung, daß die eng mit der Paracetamol-Metabolisierung verknüpfte LPO die Folge eines nicht-stöchiometrischen radikalischen Sekundärprozesses darstellt.

Nach Ansicht verschiedener Arbeitsgruppen beruht die toxische Wirkung von Paracetamol auf dem Funktionsverlust essentieller Makromoleküle in Folge der Proteinbindung eines toxischen, elektrophilen Paracetamol-Metaboliten. Sie zeigten, daß die Proteinbindung von Paracetamol in den Mikrosomen PB- und 3-MC-induzierter Mäuse 2.8-fach gegenüber den Kontrollen gesteigert ist [11] und daß in vivo rund 1.2 mal mehr Paracetamol proteingebunden vorliegt bei PB-induzierten Mäusen im Vergleich zu nicht-induzierten Kontrollen [24]. Aus den hier gezeigten Versuchen geht im Vergleich mit

diesen Proteinbindungsstudien hervor, daß LPO und Proteinbindung quantitativ nicht miteinander korrelieren.

Eine subtoxische Paracetamoldosis führt bei induzierten Tieren zwar zu gesteigerter LPO, erhöht aber die Sterblichkeitsrate nicht signifikant. Demgegenüber starben fast alle nicht-induzierten Tiere innerhalb des Beobachtungszeitraumes, wenn sie mit einer sehr hohen Paracetamoldosis belastet wurden (Tab.1), d.h. die Letalität von Paracetamol ist streng Dosis-bezogen, nicht aber das Ausmaß der LPO, das eher von der Metabolisierungsrate bzw. der Aktivität der mischfunktionellen Monooxygenase abhängt.

In einer analog konzipierten Versuchsreihe wurde gezeigt, daß durch Hemmung des Monooxygenasesystems die Paracetamol-induzierte LPO nahezu vollständig unterdrückt werden kann.

Diäthyldithiocarbamat, SKF-525 A, Metyrapon und Pyrazol besitzen eine hohe Affinität zum Cytochrom-P-450-System, sie werden aber nicht meßbar umgesetzt und wirken so als kompetitive Inhibitoren gegenüber potentiellen Substraten. Perfluorhexan besitzt dagegen nur geringe Affinität zum Cytochromsystem und hemmt erwartungsgemäß die Paracetamol-induzierte LPO geringer.

α-Naphthoflavon, das als spezifischer Inhibitor des Cytochrom-P-448-Systems gilt, hemmt die LPO dosisabhängig bei BP- und 3-MC-induzierten Tieren. Die Kreuzkontrollversuche zeigen, daß das Cytochrom-P-450-spezifische SKF-525 A die Paracetamol-induzierte Äthanexhalation bei BP-induzierten Tieren erwartungsgemäß nicht hemmt, während α-Naphthoflavon auch bei PB-induzierten Tieren die LPO vollständig unterdrückt.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Arzneimittel-induzierte LPO funktionell mit der Aktivität des Arzneimittel-metabolisierenden Monooxygenasesystems zusammenhängt.

5.3.1. Mögliche molekulare Ursache der Paracetamol-induzierten Lipidperoxidation

Es stellt sich nun die Frage, welches molekulare Ereignis letztlich die Peroxidation von Zell-Lipiden herbeiführt.

Es existieren klare Hinweise dafür, daß in vitro ein Teil des Sauerstoffes, der bei der mikrosomalen Arzneimittel-Oxidation verbraucht wird, in Form von H_2O_2 freigesetzt wird [70,71]; Entsprechendes wurde auch im rekonstituierten System gemessen [72]. Weitere in-vitro-Experimente unterstützen die Hypothese, daß vom Oxy-Komplex des Cytochroms-P-450 im Verlauf der Arzneimittel-Oxidation das Superoxidanion ($O_2^{-\cdot}$) freigesetzt wird, das spontan oder enzymkatalysiert zu H_2O_2 dismutiert [73-75]. Beide Agentien ($O_2^{-\cdot}$ und H_2O_2) sind in der Lage, polyungesättigte Fettsäuren zu peroxidieren [76,77], was letztlich zur Freisetzung von Äthan aus ω-3-polyungesättigten Fettsäuren, Pentan aus ω-6-Fettsäuren und Bildung von Malondialdehyd führt. In vivo kann durch SOD-wirksame Kupferkomplexe die Paracetamol-induzierte LPO unterdrückt werden [78].

Die Paracetamol-induzierte LPO läßt sich unter Zugrundelegung dieses Konzeptes wie folgt erklären:

Im Verlauf der Paracetamolmetabolisierung werden reaktive Sauerstoffspezies frei, die in der Lage sind, Membranlipide zu peroxidieren. Auf der anderen Seite können H_2O_2 und eventuell auch Fettsäurehydroperoxide über die GSH-POD-Reaktion entgiftet werden, solange genügend GSH vorhanden ist. Wenn der GSH-Pool aber einerseits durch Hunger oder Sucrosediät und andererseits durch die Konjugationsreaktion mit dem elektrophilen Paracetamol-Metaboliten erschöpft wird, fällt dieses Schutzsystem aus und die LPO wird manifest.

In Erweiterung dieser Vorstellung müssen dann auch andere Pharmaka LPO in vivo hervorrufen, wenn folgende Voraus-

setzungen erfüllt sind:

Diese Substanzen müssen Substrate der mischfunktionellen Monooxygenase sein. Ihre Metaboliten müssten entweder mit GSH konjugiert werden, oder die Phase-II-Biotransformation müsste durch exogene GSH-absenkende Agentien wie z.B. DEM imitierbar sein.

Andererseits müsste sich die Ausschaltung des Schutzenzyms GSH-POD positiv auf die LPO auswirken.

5.4. Arzneimittel-induzierte Lipidperoxidation

5.4.1. Diäthylmaleat als GSH-Depletor

Aminoantipyrin und Äthylmorphin sind in vitro gute Substrate der mischfunktionellen Monooxygenase. Ihre Metaboliten werden im Gegensatz zu Paracetamol nicht mit GSH konjugiert.

Keines dieser zwei Substanzen führt in toxischen Dosen in vivo zu LPO oder GSH-Abnahme in der Leber, auch wenn zuvor zusätzlich DEM appliziert wurde (Tab.4, Se^{+}). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß in Folge einer geringen Metabolisierungsrate nicht genügend toxische Sauerstoffspezies ($O_2^{-}\cdot$ oder H_2O_2) freigesetzt werden, um LPO zu initiieren, oder daß ausreichend Restglutathion vorhanden ist, die GSH-POD-Reaktion aufrechtzuerhalten. Das letztgenannte Argument wird unterstützt durch die Tatsache, daß DEM den Hunger- bzw. Sucrose-insensitiven GSH-Pool nur um ca. 30 % verringert, während DEM bei nicht gehungerten Tieren eine GSH-Depletion hervorruft, die quantitativ etwa der Menge an "labilem" GSH entspricht.

Obwohl die DEM-induzierte GSH-Abnahme bei Sucrose-gefütterten Tieren quantitativ gesehen kaum ins Gewicht fällt, scheint der davon betroffene GSH-Anteil aber für die Leberzelle eine besondere Rolle zu spielen. Schon kleine subtoxische Paracetamoldosen führen bei Sucrose-gefütterten und DEM-vorbehandelten Mäusen zu erheblicher Äthanexhalation, wohingegen

die nicht mit DEM behandelten Kontrollen keinerlei Anzeichen von LPO zeigen. Das Leber-GSH dieser Kontrolltiere wird durch 100 mg/kg Paracetamol nicht beeinflußt, während in den Lebern der doppelt belasteten Tiere ein extremer GSH-Verlust resultiert (60 %),der eventuell auf die GSH-POD-Reaktion oder auf passiven GSH-Efflux in Folge peroxidativer Zellzerstörung zurückzuführen ist. Es muß an dieser Stelle besonders daraufhingewiesen werden, daß DEM allein in der hier verwendeten Applikationsform abgesehen von der GSH-absenkenden Wirkung keine der hier gemessenen Parameter signifikant beeinflußt (Serum-Transaminasen,GSH-POD, SOD, Katalase, S-Transferasen etc.), während 3-4 Stunden nach DEM eine sichtbare Nierenschädigung auftritt.

In einem analogen Versuchsansatz wurden DEM-vorbehandelte Selen-Mangel-Mäuse wiederum mit subtoxischen Dosen Paracetamol oder mit toxischen Dosen Aminoantipyrin oder Äthylmorphin belastet. Diese Tiere atmeten in kurzer Zeit extrem hohe Äthanmengen ab. Die LPO war begleitet von nahezu quantitativem GSH-Verlust, hoher Sterblichkeitsrate, gewaltigem Aktivitätsanstieg der Serumtransaminasen und großen Verlusten von Docosahexaensäure und Arachidonsäure im Lipidextrakt der Leber (Tab.4, Tab.6).

Ebenso führt das Arzneimittel Furosemid bei DEM-vorbehandelten Selen-Mangel-Mäusen zu einer zwar geringeren, aber dennoch signifikanten LPO. Allerdings scheint bei diesem Pharmakon die Aktivität der mikrosomalen Monooxygenase limitierend zu sein.

PB-Induktion steigert die Furosemid-induzierte LPO wesentlich stärker als Selenmangel bei nicht-induzierten Tieren (Tab. 5).

Dies trifft auch für das Cytochrom-P-450-Substrat Äthoxycumarin zu, das nur bei PB-induzierten Mäusen signifikant zu Äthanexhalation führt.

5.4.2. Lipidperoxidation und Selenstatus

Die herausragende Konsequenz eines alimentär erzeugten Selenmangels ist der Verlust an GSH-POD-Aktivität unter einen Minimalwert (~ 5 %, Tab.7). Dagegen werden andere wichtige Schutzenzyme der Leberzelle durch den Selenmangel nicht negativ beeinflusst. Katalase, SOD und GSH-S-Transferase-Aktivitäten bleiben im Selenmangel unverändert (Tab.9 und 10), während die Aktivität der Glutathionreduktase sogar leicht zunimmt (Tab.8).

Im Gegensatz zur Ratte [42] wird bei der Maus im Selenmangel keine Induktion der nichtselenhaltigen Peroxidase beobachtet (Tab.7). Ebenso beeinflusst der Selenstatus weder den Gesamt-GSH-Gehalt der Leber noch den GSH/GSSG-Quotienten (Tab.8).

Der Plasma-Vitamin-E-Gehalt ist bei Selen-Mangel-Mäusen sogar deutlich höher als bei Selen-supplementierten Tieren (Tab. 10). Dies schließt somit aus, daß die erhöhte Arzneimittel-Toxizität im Selenmangel ein Vitamin-E-Effekt ist.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß alle an der Phase-II-Biotransformation beteiligten Substrat- und Enzymparameter und andere potentielle Entgiftungsmechanismen funktionell vom Selenmangel nicht betroffen sind.

Die große Anfälligkeit von Selen-Mangel-Tieren gegenüber Arzneimittel-induzierter LPO ist demnach eine Folge des nahezu quantitativen Verlustes an GSH-POD-Aktivität.

Es ist allerdings nicht verständlich, warum im Selen-Mangel eine zusätzliche exogene GSH-Absenkung Voraussetzung dafür ist, daß Pharmaka außer Paracetamol in vivo zu LPO führen.

Es ist bis jetzt noch offen, ob die ebenfalls GSH-abhängige nichtselenhaltige GSH-POD, die nach LAWRENCE [44] mit der GSH-S-Transferase B identisch ist, im Selenmangel die Hydroperoxidentgiftung ganz oder teilweise übernehmen kann. Die Notwendigkeit einer zusätzlichen, exogenen GSH-Ab-

senkung ließe sich dann damit erklären, daß durch Substrat-limitierten Aktivitätsverlust dieser GSH-Peroxidase organische Hydroperoxide nicht mehr entgiftet werden.

5.5. Propylthiouracil-Einfluß auf die Paracetamol-induzierte Lipidperoxidation

Das Pharmakon Propylthiouracil erzeugt nach mehrmaliger Applikation eine Schilddrüsenunterfunktion bei der Ratte. PTU hemmt nicht nur die Bildung des Hormons Thyroxin, sondern auch dessen Umwandlung in die Wirkform Trijodthyronin [63]. Die gleichzeitig auftretende Erhöhung des Gesamtleber-Glutathions wird von den Autoren als Folge dieser hypothyreotischen Stoffwechsellage diskutiert. Weiter wurde in dieser Untersuchung gezeigt, daß PTU-Vorbehandlung von Ratten die Paracetamol-induzierte Lebernekrose erfolgreich unterdrückt.

Nach Meinung der Autoren beruht dieser Schutzeffekt von PTU auf der Erhöhung des Leberglutathions, wodurch der Paracetamol-bedingte Konzentrationsabfall dieses Tripeptids unter einen kritischen Grenzwert verhindert wird.

Nach einer neueren Untersuchung wirkt PTU in vitro auch als Hemmer der GSH-S-Transferase B und zwar kompetitiv zu GSH und unkompetitiv zum elektrophilen Substrat [64].

PTU wurde in einer einzelnen Dosis von 170 mg/kg, entsprechend 10 mM bezogen auf eine Mäuseleber, eine Stunde vor Paracetamol i.p. appliziert. Die Dosis von PTU und die Applikationszeit waren so kalkuliert, daß eine effektive Hemmung der GSH-S-Transferasen in vivo, nicht aber ein hormonell bedingter Anstieg des Leberglutathions zu erwarten war.

Wie aus Tabelle 11 zu entnehmen ist, führt PTU allein weder zu einer Veränderung des GSH-Spiegels noch zu LPO.

PTU-vorbehandelte Tiere exhalieren nach einer toxischen Paracetamoldosis kein Äthan ab. Interessanterweise ist

bei diesen Tieren die Aktivität der GSH-S-Transferasen signifikant höher als bei den PTU- bzw. Paracetamol-belasteten Kontrollen. Die Ursache für diesen unerwarteten Befund ist nicht bekannt.

Möglicherweise geht auf Grund einer höheren Stabilität des PTU-Enzymkomplexes im Vergleich zum freien Enzym im Verlauf der Homogenatspräparation etwas weniger GSH-S-Transferase-Aktivität verloren.

Andererseits zeigt dieses Ergebnis, daß auch in vivo keine irreversible Enzymhemmung durch PTU erfolgt.

Der Glutathiongehalt der PTU- und Paracetamol-belasteten Tiere ist trotz fehlender LPO nur unwesentlich höher als das Leber-GSH der Äthan-exhalierenden Paracetamol-belasteten Kontrollen.

Da dieser GSH-Abfall aufgrund der gehemmten GSH-S-Transferase-Aktivität nicht auf die Konjugation des elektrophilen Paracetamolmetaboliten mit GSH zurückzuführen ist, steht als einziger GSH-verbrauchender Prozess die GSH-POD-Aktivität zur Diskussion.

Das Fehlen von LPO, trotz toxischer Paracetamolgabe, läßt sich somit durch die hohe, nicht substratlimitierte GSH-POD-Aktivität erklären.

Weiterhin ist dieses Ergebnis ein guter Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese, daß der freie Paracetamolmetabolit nicht die Ursache der zelltoxischen Wirkung von Paracetamol ist.

5.6. Schwermetall-Intoxikation

710 ppm Silber im Trinkwasser normal ernährter Mäuse führt zeitabhängig zum Verlust der GSH-POD-Aktivität in Leber und Erythrozyt (Tab.12). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Befunden von WAGNER et al. [79], die bei Ratten

nach 15-wöchiger Silbersupplementation (751 ppm) nur noch 5 % GSH-POD-Aktivität in der Leber und noch 63 % Aktivität im Erythrozyten nachweisen konnten.

Die Ursache dieses Aktivitätsverlustes ist nicht geklärt. Es besteht die Möglichkeit, daß Silber das Enzym selbst hemmt [80], oder, was nach dem zeitlichen Verlauf der Aktivitätsabnahme wahrscheinlich ist, daß Silber mit dem Selenmetabolismus interferiert.

Entsprechend zu Selenmangel-ernährten Tieren zeigen Silber-belastete Tiere eine stark erhöhte Arzneimittelsensibilität. Paracetamol- , Aminoantipyrin- oder Äthylmorphin-Intoxikation führt bei gehungerten DEM-vorbehandelten Silber-belasteten Mäusen zu extremer Äthanexhalation. Die LPO ist begleitet von sehr hohen Transaminase-Aktivitäten im Serum, was als ein sicherer Index für akute Lebernekrotisierung angesehen werden kann.

Aus anderen Arbeiten ist bekannt, daß Silber unter gewissen metabolischen Bedingungen in vivo stark zelltoxisch wirkt.

Kombinierter Vitamin-E- und Selenmangel führt bei Ratten zur Ausbildung von Lebernekrose. Verschiedene Schwermetallionen können diese alimentär erzeugte Leberschädigung teilweise potenzieren oder sogar hemmen [81]. Unter 19 untersuchten Elementen erwies sich Ag^+ als besonders nekrosefördernd. Dieser Silbereffekt ließ sich durch Selen teilweise und durch Vitamin E vollkommen aufheben. Obwohl Quecksilber im Gegensatz zu Silber in vitro keinen Effekt auf die GSH-POD-Aktivität zeigt [82], ist es bei in-vivo-Applikation wie Silber in der Lage,die GSH-POD zu inaktivieren, eine Potenzierung der Lebernekrose bei Vitamin-E- und Selenmangelratten wird aber nicht beobachtet [81]. Die Autoren schließen daraus, daß der Nekrose-fördernde Silbereffekt nicht mit dem Aktivitätsverlust der GSH-POD zusammenhängt, sondern, daß Silber auf Grund seiner leichten Reduzierbarkeit zellschädigende Oxidationsvorgänge hervor-

ruft, die letztlich den Zelltod beschleunigen.

Im Gegensatz zu dieser Untersuchung wurde im eigenen Experiment im Verlauf der Silberbelastung über 1-2 Monate ein zwar Vitamin E-armes, aber selenadäquates Futter verabreicht. Die einzige, biochemisch faßbare Konsequenz der Silber-Intoxikation in diesem System ist die totale Inaktivierung der GSH-POD. Es bleibt dahingestellt, ob Silber in vivo direkt mit der selenhaltigen GSH-POD in Wechselwirkung tritt, oder ob Silber mit dem Selen aus der Nahrung reagiert und so einen exogenen Selenmangel hervorruft.

Die große Arzneimittelsensibilität Silber-belasteter Tiere ist demnach ebenso eine Folge der Inaktivierung der GSH-POD, wie dies auch bei Selen-Mangel-Tieren zutrifft.

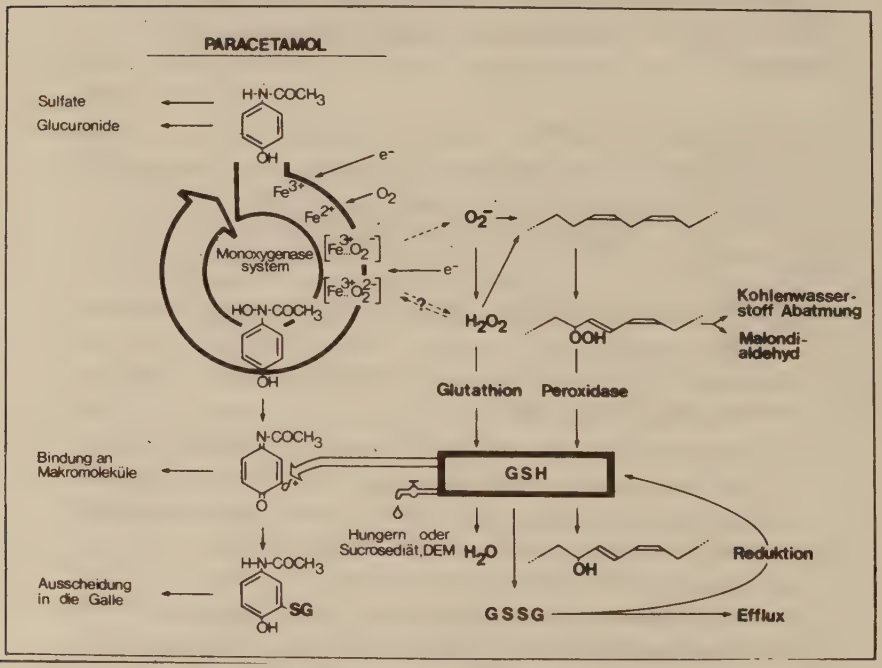
5.7. Schlußfolgerungen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß chemisch vollkommen unterschiedliche Pharmaka bei der Maus in vivo zu LPO führen, wenn folgende metabolische Bedingungen erfüllt sind:

1) Die Pharmaka müssen die Phase I der Biotransformation durchlaufen.
2) Das Leberglutathion muß vor Applikation eines Pharmakons vermindert sein:
   a) endogen durch Hunger bzw. 2-tägige Fütterung von Sucrose. Die endogene GSH-Depletion ist eine ausreichende Bedingung für LPO in vivo, wenn der Metabolit des Pharmakons in der Biotransformationsphase II mit GSH konjugiert wird.
   b) exogen durch Vorbehandlung mit GSH-absenkenden Agentien (z.B. DEM). Diese exogene GSH-Depletion ersetzt die Phase-II-Konjugation bei Pharmaka, deren Metabolite nicht mit GSH konjugiert werden.
3) Die Aktivität der GSH-POD muß vermindert sein. Alimentärer Selenmangel in Kombination mit endogener GSH-Depletion potenziert die LPO in vivo bei Arz-

neimitteln, deren Metabolite mit GSH konjugiert werden. Eine zusätzliche exogene GSH-Absenkung ist notwendig, damit Arzneimittel, die nur die Phase I der Biotransformation durchlaufen, in vivo zu LPO führen.

Das folgende Schema zeigt am Beispiel von Paracetamol den hypothetischen Mechanismus der Arzneimittel-induzierten LPO in vivo. Hier soll versucht werden, die empirischen Befunde dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen in einem logischen Konzept zusammenzufassen:



5.8. Offene Fragen

Ungeklärt ist die Frage, ob LPO und Lebernekrose in kausalem Zusammenhang stehen. Die eigenen Befunde zeigen, daß LPO unabhängig vom eingesetzten Pharmakon immer von extremen Aktivitätsanstiegen der Serumtransaminasen begleitet ist. Dies ist ein guter Hinweis auf die Existenz schwerer Organnekrosen.

Die Befunde anderer Arbeitsgruppen sind widersprüchlich: Diquat- und Paraquat-Intoxikation bei Selenmangel-Ratten führt zu LPO und Lebernekrosen [66], während nach Applikation von Paracetamol, Thioacetamid oder verschiedenen halogenierten Kohlenwasserstoffen in die Ratte zwar eine schwere Lebernekrose, aber keine signifikante LPO festgestellt werden konnte [83].

Offen und strittig im Gesamtkomplex der Arzneimitteltoxizität ist die Frage, ob die Proteinbindung eines Arzneimittelmetaboliten ursächlich an der Zellzerstörung beteiligt ist.

Im speziellen Fall von Paracetamol wurde das Proteinbindungs-Toxizitätsprinzip angezweifelt. α-Mercaptopropionylglycin [25], Cystein und N-Acetyl-Cystein [26] hemmen die Ausbildung der Lebernekrose, ohne das Ausmaß der Proteinbindung des Paracetamolmetaboliten zu beeinflussen. Auch aus anderen Arbeiten ist bekannt, daß der Metabolit eines Pharmakons ausgeprägte kovalente Bindung zeigen kann, ohne sichtbare Organschäden hervorzurufen [27,28].

Es erscheint vom biochemischen Standpunkt aus nicht ratsam, organotoxische Wirkungen eines Pharmakons allein am Ausmaß der post mortem bestimmten Metabolitenbindung zu bewerten. Die Identifizierung des molekularen Angriffsortes eines Metaboliten würde dagegen die Interpretation dieser komplexen Vorgänge wesentlich erleichtern.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

[1] BLACK M. (1980) Gastroenterol. 78, 382-392

[2] WENDEL A., FEUERSTEIN S., KONZ K.H. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 2051-2055

[3] Mc LEAN A.E.M., DAY P. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 37-42

[4] PESSAYRE D., DOLDER A., ARTIGON J.Y. (1979) Gastroenterol. 77, 264-271

[5] BOYLAND E., CHASSEAUD L.F. (1970) Biochem. Pharmacol. 19, 1526-1528

[6] MITCHELL J.R., JOLLOW D.J., POTTER W.Z., GILLETTE J.R., BRODIE B.B. (1973) Pharmacol. Exp. Ther. 187, 211-217

[7] Mc LEAN A.E.M. (1974) Lancet 1, 729-729

[8] MITCHELL J.R., THORGEIRSSON S.S., POTTER W.Z., JOLLOW D.J., KEISER H. (1974) Clin. Pharmacol. Ther. 16, 676-684

[9] PRESCOTT L.F., PARK J., PROUDFOOT A.T. (1976) J. Int. Med., 4, 112-117

[10] MITCHELL J.R., JOLLOW D.J., POTTER W.Z., DAVIS D.C., GILLETTE J.R., BRODIE B.B. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther., 187, 185-194

[11] POTTER W.Z., DAVIS D.C., MITCHELL J.R., JOLLOW D.J., GILLETTE J.R., BRODIE B.B. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 203-210

[12] GOODING P.E., CHAYEN J., SAWYER B., SLATER T.F. (1978) Chem. Biol. Interact. 20, 299-310

[13] SMITH M.T., LOVERIDGE N., WILLS E.D., CHAYEN J. (1979) Biochem. J. 182, 103-108

[14] WENDEL A. (1980) in: Enzymatic Basis of Detoxication (Ed.: JAKOBY W.B.) Vol.I 333-353 Acad. Press - New York

[15] MOLDEUS P. (1978) in: Conjugation Reactions in Drug Biotransformations (Ed.: AITIO A.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press 293-302

[16] MUDGE G.H., GEMBORYS M.W., DUGGIN G.G. (1978) J. Pharmacol. Exp. Ther. 206, 218-226

[17] POTTER W.Z., THORGEIRSSON S.S., JOLLOW D.J., MITCHELL J.R. (1974) Pharmacology 12, 129-143

[18] HINSON J.A., POHL L.R., GILLETTE J.R. (1979) Life Science 24, 2133-2138

[19] GEMBORYS M.W., GRIBBLE G.W., MUDGE G.H. (1978) J. Med. Chem. 21, 649-652

[20] NELSON S.D., FORTE A.J., DAHLIN D.C. (1980) Biochem. Pharmacol. 29, 1617-1620

[21] HEALY K., CALDER J.C., YOUNG A.C., CROWE C.A., FUNDER C.C., HAM K.N., TANGE J.D. (1978) Xenobiotica 8, 403-413

[22] HINSON J.A., POHL L.R., MONKS T.J., GILLETTE J.R., GUENGERICH F.P. (1980) Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther. 8, 289-294

[23] MINER D.J., KISSINGER P.T. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 3285-3290

[24] JOLLOW D.J., MITCHELL J.R., POTTER W.Z., DAVIS D.C., GILLETTE J.R., BRODIE B.B. (1973) J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 195-202

[25] LABADARIOS D., DAVIS M., PORTMANN B., WILLIAMS R. (1977) Biochem. Pharmacol. 26, 31-35

[26] GERBER J.G., Mac DONALD J.S., HARBISON R.D., VILLEUNEUVE J.P., WOOD A.J.J., NIES A.S. (1977) Lancet 1, 657-658

[27] KRISHNA G., DOCKS E., CORSINI G.U. (1973) Fed. Proc. 32, 319-319

[28] KRISHNA G. (1974) Med. J. 50, 73-77

[29] CHOW C.K. (1979) Am. J. Clin. Nutr. 32, 1066-1081

[30] HORGAN V.J., PHILPOT J.St.L., PORTER B.W., ROODYN D.B. (1957) Biochem. J. 67, 551-558

[31] Mc CAY P.B., FONG K.L., LAI E.K., KING M.M.(1978) in: Tocopherol, Oxygen and Biomembranes (Ed.: de DUVE C., HAYAISHI O.) 41-57 , Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam - New York

[32] TAPPEL A.L. (1978) Advances in Exp. Med. and Biol. 97, 111-131

[33] HASSAN H M., FRIDOVICH I. (1980) in: Enzymatic Basis of Detoxication (Ed.: JAKOBY W.B.) Vol. I, 311-326 Academic Press - New York

[34] FLOHÉ L., GÜNZLER W.A., SCHOCK H.H. (1973) FEBS Lett. 32, 132-134

[35] MILLS G.C. (1957) J. Biol. Chem. 229, 189-197

[36] SIES H. (1974) Angew.Chem.Int.Ed.Engl. 13, 706-718

[37] Mc CAY P.B., GIBSON D.D., FONG K.L., HORNBROOK R., (1976) Biochim. Biophys. Acta, 431, 459-468

[38] SIES H., SUMMER K.H. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 503-512

[39] SIES H., BARTOLI G.M., BURK R.F., WAYDHAS C. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 113-118

[40] HAFEMAN D.G., HOEKSTRA W.G. (1977) J. Nutr. 107, 666-672

[41] LAWRENCE R.A., BURK R.F. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 952-958

[42] LAWRENCE R.A., BURK R.F. (1978) J. Nutr. 108, 211-215

[43] PROHASKA J.R., GANTHER N.E. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 437-445

[44] LAWRENCE R.A., PARKHILL L.K., BURK R.F. (1978) J. Nutr. 108, 981-987

[45] CHASSEAUD L.F. (1973) Biochem. J. 131, 765-769

[46] BOYLAND E., CHASSEAUD L.F. (1969) Adv. Enzymol. 32, 173-177

[47] KEEN J.H., JAKOBY W.B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5 654-5 657

[48] KETTERER K., LITWACK L., ARIAS A. (1971)
Nature 234, 466-467

[49] PROHASKA J.R. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 611, 87-98

[50] RIELY C.A., COHEN G., LIEBERMAN M. (1974)
Science 183, 208-210

[51] HEATH R.C., PACKER L. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 716-721

[52] BREHE J.E., BURCH H. (1976)
Analyt. Biochem. 74, 184-197

[53] BARTOLI G.M., SIES H. (1978) FEBS.Lett. 86, 89-91

[54] BERGMEYER H.U. (Ed.) (1970) in: Methoden der
enzymatischen Analyse Vol.I, 421-423
Verlag Chemie Weinheim

[55] BIERI J.G., PIVAL E.L. (1965)
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 120, 554-559

[56] GÜNZLER W.A., KREMERS H., FLOHÉ L. (1974)
Z.klin.Chem.klin.Biochem. 12, 444-448

[57] HABIG W.H., PABST M.J., JAKOBY W.B. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 7 130 - 7 139

[58] MISRA H.P., FRIDOVICH I. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 181, 308-312

[59] HÜBL P., BRETSCHNEIDER R. (1964)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 335, 146-155

[60] OMURA T., SATO R. (1964) J.Biol.Chem. 239, 2 370 - 2 378

[61] LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.
(1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

[62] TATEISHI H., HIGASHI T., SHINGA S., NARUSE A.,
SAKAMOTO Y. (1974) J. Biochem. 75, 93-103

[63] LINSCHEER W.G., RAHEJA K.L., CHO C., SMITH N.J.
(1980) Gastroenterol. 78, 100-107

[64] YAMADA T., KAPLOWITZ N. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 3 508 - 3 513

[65] KÖSTER U., ALBRECHT D., KAPPUS H. (1977)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 639-648

[66] BURK R.F., LAWRENCE R.A., LANE J.M. (1980)
J. Clin. Invest. 65, 1 024 -1 031

[67] HIGASHI T., TATEISHI N., NARUSE A., SAKAMOTO Y. (1976) Biochem.Biophys.Res.Commun. 68, 1 280 - 1 286

[68] HIGASHI T., TATEISHI N., NARUSE A., SAKAMOTO Y. (1977) J. Biochem. 82, 117-124

[69] LAUTERBURG B.H., VAISHNAV Y., STILLWELL W.G., MITCHELL J.R. (1980)
J. Pharmacol. exp. Ther. 213, 54-58

[70] GILLETTE J.R., BRODIE B.B., LA DU B.N. (1957)
J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 532-537

[71] HILDEBRANDT A.G., ROOTS J. (1975)
Arch. Biochem. Biophys. 171, 385-397

[72] NORDBLOM G.D., COON M.J. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 180, 343-347

[73] STROBEL H.W., COON M.J. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 7 826 - 7 829

[74] RICHTER C., AZZI A., WESER U., WENDEL A.(1977)
J. Biol. Chem. 252, 5 061 - 5 066

[75] KUTHAN H., TSUJI H., GRAF H., ULLRICH V., WERRINGLOER J., ESTABROOK K.W. (1978)
FEBS Lett. 91, 343-345

[76] DUMELIN E.E., TAPPEL A.L.(1977) Lipids 12, 894-900

[77] DONOVAN D.H., MENZEL D.B. (1978)
Experientia 34, 775-776

[78] WENDEL A., HEIDINGER S. (1980)
Res. Commun. Chem. Pathol. 28, 473-481

[79] WAGNER P.A., HOEKSTRA W.G., GANTHER H.E. (1975)
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148, 1 106 - 1 110

[80] SAWATZKI G., WENDEL A. (1975)
Chemica Scripta 8 A, 115-115

[81] WHANGER P.D. WESWIG P.H. (1978)
Nutr. Rep. Int. 18, 421-428

[82] SCHNEIDER F., FLOHÉ L. (1967)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 540-552

[83] BURK R.F., LANE J.M. (1979)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 50, 467-478

Lebenslauf

Am 17. März 1952 wurde ich als Tochter des technischen Angestellten Ernst Feuerstein und der Oberlehrerin Ruth Feuerstein, geb. Diethrich, in Volkertshausen, Kreis Konstanz, geboren.

Im April 1959 wurde ich in die Volksschule in Kenzingen, Kreis Emmendingen, eingeschult und wechselte im April 1964 in das neusprachlich-naturwissenschaftliche Gymnasium in Stockach über. 1972 erlangte ich dort die Allgemeine Hochschulreife und begann im Wintersemester 1972/73 mit dem Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.

Nach bestandener mündlicher Hauptprüfung im Oktober 1977 arbeitete ich bis Juni 1978 unter Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut an meiner Diplomarbeit.

Von Juli 1978 bis März 1981 wurde die vorliegende Dissertationsarbeit "Arzneimittelinduzierte Lipidperoxidation in der Maus" unter Anleitung von Prof. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut erarbeitet.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, U. Weser, D. Mecke
Organische Chemie	E. Bayer, Eu. Müller
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Theoretische Chemie	F. F. Seelig
Physikalische Chemie	H. Mauser, W. Zeil
Anatomie	K. Mörike
Physik	H. Krüger
Botanik	H. Metzner
Zoophysiologie	F. P. Möhres
Zoologie	K. G. Grell
Mathematik	E. Pracht
Mikrobiologie	V. Braun, H. Zähner
Pharmakologie	M. Siess
Toxikologie	H. Remmer, E. Pfaff
Physiologie	E. Betz
Histologie	M. Arnold

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321